



Maria João Gonçalves Marquito

Licenciada em Engenharia da Produção Animal

Influência dos aditivos de panificação na bioacessibilidade dos minerais do pão de trigo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora
Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Mariana Coelho dos Santos, Responsável do
Laboratório de Química, INSA

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando
Arguente: Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira
Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2014



Maria João Gonçalves Marquito

Licenciada em Engenharia da Produção Animal

Influência dos aditivos de panificação na bioacessibilidade dos minerais do pão de trigo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora
Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Mariana Coelho dos Santos, Responsável do
Laboratório de Química, INSA

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando
Arguente: Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira
Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2014

Direitos de Cópia/Copyright – Maria João Gonçalves Marquito, FCT-UNL, UNL

*“Influência dos aditivos de panificação na bioacessibilidade dos minerais do pão de trigo”,
Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar.*

A Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, pela simpatia, disponibilidade e por garantir aos alunos, todos os meios e condições à realização de trabalhos como este.

À Doutora Isabel Castanheira, Dra. Mariana Santos e Eng.^a Ana Cláudia Nascimento do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, por me terem amavelmente recebido e fornecido os melhores recursos para a determinação dos minerais dos pães através da técnica de ICP-OES, foram fundamentais na conclusão deste trabalho.

Aos professores do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, todos contribuíram de forma determinante na minha formação.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Paula Duarte, um OBRIGADO do tamanho do mundo! Pelo apoio, pelos conhecimentos transmitidos, pela sua total disponibilidade, pela ajuda na superação dos obstáculos que foram surgindo no decorrer do trabalho. Obrigado pela paciência, compreensão e também, por todo o acompanhamento, que exigiu um esforço acrescido devido às muitas horas diárias que o trabalho experimental requeria.

À minha mãe, ao meu irmão, cunhada e sobrinha, essenciais na minha vida, por estarem sempre comigo, em todos os momentos, apoiando-me e ajudando-me incondicionalmente.

Ao David, que juntos atravessamos mais esta etapa da minha vida, o meu obrigado por tudo!

A todos os meus amigos, que de uma forma ou de outra me acompanharam nesta caminhada.

À D. Rita, D. Rosa e D. Lurdes, pela amizade, por toda a simpatia e boa disposição, que nas alturas mais difíceis tornam tudo bem mais fácil.

Resumo

O uso de aditivos na panificação tem-se intensificado nos últimos anos, contudo não são conhecidos os seus efeitos na bioacessibilidade/biodisponibilidade dos nutrientes e em particular dos minerais, do pão.

O presente estudo teve por objetivo estudar a influência dos aditivos de uso corrente na panificação, nomeadamente o E300, E471, E472e e E322, sobre a bioacessibilidade dos minerais Zn, Fe, Mg, Ca e K, do pão de trigo. Para tal, formularam-se 13 pães com a mesma receita base, variando a adição e conjugação dos aditivos referidos. Para quantificar o total de minerais dos pães, as amostras foram digeridas por via seca e analisadas por ICP-OES. Para quantificar apenas a fração bioacessível, as amostras foram sujeitas a uma simulação da digestão gastrointestinal (digestão *in vitro*), centrifugadas, tendo os sobrenadantes sido igualmente digeridos por via seca e analisados por ICP-OES. Os resultados mostraram que o total de minerais nos pães não se alterou de forma significativa com os aditivos utilizados, com exceção dos pães que possuíam na sua formulação E472e, que apresentaram um incremento de cálcio proveniente da constituição do aditivo. Relativamente ao efeito dos aditivos sobre a bioacessibilidade dos minerais verificou-se dos minerais Zn, Ca, Mg e K, a bioacessibilidade do Ca foi a mais afetada pela presença dos aditivos e a do K a menos afetada. O E300 isoladamente exerceu um efeito positivo sobre a bioacessibilidade do Zn e não afetou significativamente a bioacessibilidade do Mg e do K. O E472e foi o aditivo que afetou de forma mais negativa a biodisponibilidade do Zn, possivelmente devido ao seu teor em Ca. O E471, o E472e e o E322 diminuíram a bioacessibilidade do Mg. Para o Ca, todos os aditivos afetaram a sua solubilização.

Palavras-chave: Bioacessibilidade, Micronutrientes, Pão, Aditivos alimentares.

Abstract

The use of additives in bakery has intensified in recent years, although their effects on bioaccessibility / bioavailability of nutrients and minerals in particular are not known, in bread.

The present study aimed to research the influence of currently used bakery additives, namely E300, E471, E472e and E322 on the bioaccessibility of minerals Zn, Fe, Mg, Ca and K, of wheat bread. To this end, 13 breads were formulated with the same basic recipe, varying the addition of additives and combination of the mentioned additives. To quantify the total mineral content in the breads, the samples were dry digested and analyzed by ICP-OES. To quantify only bioaccessible fraction, the samples were subjected to a simulated gastrointestinal digestion (*in vitro* digestion), centrifuged, and the supernatants were also dry digested and analyzed by ICP-OES. The results showed that the total amount of minerals in the breads had no significant changes with the used additives, except in those that possessed E472e in its formulation, which showed an increase of calcium from the constitution of the additive. It was found that within the minerals Zn, Ca, K, Mg, Ca bioaccessibility was the most affected by the presence of additives and K the less affected. The E300 alone had a positive effect on the bioaccessibility of Zn and did not significantly affect the bioaccessibility of Mg and K. E472e was the additive that more adversely affected the Zn bioavailability, possibly due to its content in Ca. The E471, E322 and E472e decreased bioaccessibility of Mg. For Ca, all additives affected their solubilization.

Key words: Bioaccessibility, Micronutrients, Bread, Food additives.

Índice Geral

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. O pão e a sua importância..... | 2 |
| 1.2. Constituintes principais do pão | 3 |
| 1.2.1. Farinha..... | 3 |
| 1.2.1.1. O trigo na panificação | 4 |
| 1.2.2. Água | 7 |
| 1.2.3. Sal..... | 7 |
| 1.2.4. Levedura | 8 |
| 1.3. O Processo de Panificação | 9 |
| 1.3.1. Mistura | 9 |
| 1.3.2. Fermentação | 9 |
| 1.3.3. Cozedura..... | 10 |
| 1.3.4. Armazenamento | 11 |
| 1.4. Aditivos alimentares utilizados na Panificação | 11 |
| 1.4.1. Ácido Ascórbico (E300) | 12 |
| 1.4.2. Lecitina (E322) | 13 |
| 1.4.3. Mono e diglicéridos de ácidos gordos (E471) | 14 |
| 1.4.4. Ésteres monoacetiltartáricos e diacetiltartáricos de mono e diglicéridos de ácidos gordos (E472e) | 15 |
| 1.5. Composição nutricional do pão..... | 16 |
| 1.6. Minerais no pão..... | 17 |
| 1.6.1. Ferro | 17 |
| 1.6.2. Cálcio..... | 18 |
| 1.6.3. Zinco | 19 |
| 1.6.4. Magnésio..... | 20 |
| 1.6.5. Potássio | 21 |
| 1.7. Bioacessibilidade e Biodisponibilidade..... | 22 |
| 1.8. Metodologias para determinação da bioacessibilidade/biodisponibilidade | 24 |
| 1.8.1 Métodos <i>in vivo</i> | 24 |
| 1.8.2. Métodos <i>in vitro</i> | 26 |
| 1.8.3. Biodisponibilidade dos minerais..... | 27 |
| 1.8.4. Condicionantes da biodisponibilidade dos minerais nos cereais e derivados | 29 |
| 1.8.5. Biodisponibilidade do Ferro | 31 |
| 1.8.6. Biodisponibilidade do Zinco | 33 |
| 1.8.7. Biodisponibilidade de Cálcio | 34 |
| 1.8.8. Biodisponibilidade do Magnésio..... | 35 |
| 1.8.9. Biodisponibilidade do Potássio | 35 |
| 1.9. Enquadramento e Objetivos | 35 |

| | |
|---|----|
| 2. Materiais e Métodos | 37 |
| 2.1. Reagentes e Enzimas | 37 |
| 2.2. Elaboração das Amostras..... | 37 |
| 2.2.1. Receita..... | 37 |
| 2.2.2. Elaboração do pão | 38 |
| 2.2.3. Preparação das amostras..... | 38 |
| 2.3. Formulação dos pães | 38 |
| 2.4. Digestão Química..... | 39 |
| 2.5. Simulação <i>in vitro</i> da Digestão Gastrointestinal | 40 |
| 2.6. Doseamento dos metais por espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) | 41 |
| 2.7. Análise Estatística | 42 |
| 3. Resultados e Discussão | 43 |
| 3.1. Quantificação do total de minerais nos pães..... | 43 |
| 3.2. Quantificação dos minerais extraídos pela simulação da digestão gastrointestinal | 48 |
| 3.3. Determinação da Percentagem de Bioacessibilidade..... | 54 |
| 4. Conclusão..... | 59 |
| 5. Bibliografia | 61 |
| 6. Anexos..... | 69 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1. Composição em macronutrientes (valores por 100g de pão) do pão de trigo. | 16 |
| Tabela 1.2. Composição em vitaminas (valores por 100g de pão) do pão de trigo | 16 |
| Tabela 1.3. Composição em minerais (valores em mg 100g de pão) do pão de trigo | 16 |
| Tabela 2.1. Receita base utilizada na formulação dos pães..... | 38 |
| Tabela 2.2. Aditivos adicionados aos diferentes pães ensaiados. | 39 |
| Tabela 2.3. Condições de trabalho em que a análise de ICP-OES foi realizada..... | 41 |
| Tabela 2.4. Gama de trabalho na determinação de metais no ICP-OES. | 42 |
| Tabela 3.1. Concentração (mg/100g) total dos minerais nos 13 pães em estudo | 44 |
| Tabela 3.2. Concentração (mg/100g) de minerais nos 13 pães em estudo solubilizada pela digestão <i>in vitro</i> | 50 |
| Tabela 3.3. Percentagem de bioacessibilidade do Zn, Mg, Ca e K nos 13 pães..... | 55 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1. Estrutura básica do grão de trigo | 4 |
| Figura 1.2. (A) Estrutura da amilose e (B) da amilopectina | 5 |
| Figura 1.3. (A) Esquema geral simplificado de um enterócito e (B) Imagem obtida por microscopia electrónica de transmissão (TEM) de enterócitos. | 28 |
| Figura 3.1. Contribuição percentual do zinco, ferro, magnésio, cálcio e potássio para o total destes cinco minerais quantificados nos pães 1 a 13..... | 45 |
| Figura 3.2. Concentração média de zinco nos 13 pães formulados em mg/100g.. | 46 |
| Figura 3.3. Concentração média de magnésio nos 13 pães formulados em mg/100g.. | 46 |
| Figura 3.4. Concentração média de potássio nos 13 pães formulados em mg/100g..... | 47 |
| Figura 3.5. Concentração média de cálcio nos 13 pães formulados em mg/100g..... | 47 |
| Figura 3.6. Concentração média de ferro nos 13 pães formulados em mg/100g.. | 48 |
| Figura 3.7. Concentração média de zinco nos 13 pães formulados estimada a partir das digestões <i>in vitro</i> em mg/100g..... | 50 |
| Figura 3.8. Concentração média de magnésio nos 13 pães formulados estimada a partir das digestões <i>in vitro</i> em mg/100g..... | 51 |
| Figura 3.9. Concentração média de potássio nos 13 pães formulados estimada a partir das digestões <i>in vitro</i> em mg/100g..... | 52 |
| Figura 3.10. Concentração média de cálcio nos 13 pães formulados estimada a partir das digestões <i>in vitro</i> em mg/100g..... | 53 |
| Figura 3.11. Teor em Zn, Mg, Ca e K nas frações solubilizada e não solubilizada obtidas após a digestão <i>in vitro</i> do pão 2 e total de cada metal quantificado no pão 2 em mg/100g..... | 54 |
| Figura 3.12. Percentagem de bioacessibilidade do zinco nos 13 pães em análise. | 56 |
| Figura 3.13. Percentagem de bioacessibilidade do magnésio nos 13 pães em análise. | 57 |
| Figura 3.14. Percentagem de bioacessibilidade do cálcio nos 13 pães em análise. | 57 |
| Figura 3.15. Percentagem de bioacessibilidade do potássio nos 13 pães em análise. | 58 |

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

ATP - Trifosfato de adenosina

c.d.o. – Comprimento de onda

DNA - Ácido desoxirribonucleico

E300 – Ácido ascórbico

E322 - Lecitina

E471 – Mono e diglicéridos de ácidos gordos

E472e - Ésteres monoacetiltartáricos e diacetiltartáricos de mono e diglicéridos de ácidos gordos

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

g – Aceleração gravítica

GTP – Trifosfato de guanosina

ICP-OES – Espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente

ppm – Partes por milhão

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

1. Introdução

As deficiências em micronutrientes, também conhecidas por fome oculta, constituem um importante problema de saúde pública em muitas partes do mundo. Com efeito, estima-se que mais de 60% da população mundial sofra de deficiência em ferro, 30% de deficiência em zinco sendo que outras carências, como as vitamina A, iodo, cálcio e magnésio, são igualmente prevalentes (Amarakoon *et al.*, 2012; Clemens, 2014). Por definição os deficits de nutrientes surgem quando estes não são fornecidos pela dieta ao organismo durante um longo período de tempo, desenvolvendo-se o estado de deficiência (Shenkin, 1997). Este problema afeta de forma mais premente a população dos países menos desenvolvidos, onde o acesso aos bens alimentares é mais escasso e a alimentação é menos variada, mas também se faz sentir nos países mais industrializados, onde se tem verificado um aumento do consumo de alimentos muito calóricos mas nem sempre ricos em minerais e em vitaminas (Allen *et al.*, 2006).

A deficiência em micronutrientes pode causar efeitos severos, traduzindo o estado de deficiência, mas também pode manifestar-se de uma forma mais discreta causando danos nas funções dos tecidos incluindo a deficiência imunológica e danos oxidativos (Shenkin, 1997). As deficiências em minerais, mais especificamente relevantes para o presente estudo, são responsáveis por muitos efeitos adversos na saúde humana como, por exemplo, a anemia, raquitismo, osteoporose, doenças do sistema imunitário (Frontera *et al.*, 2011), alterações na capacidade reprodutiva, diminuição da capacidade de aprendizagem e produtividade do trabalho interferindo com o crescimento e desenvolvimento das crianças, por vezes de forma permanente (Johnson *et al.*, 2004).

Um dos pontos a salientar neste campo, é que o balanço dos micronutrientes no organismo não se prende somente com o que é ingerido, mas também com o que fica disponível para ser absorvido (fração bioacessível) e com o que é realmente absorvido (fração biodisponível) (Frontera *et al.*, 2011). A biodisponibilidade dos micronutrientes pode ser diferente consoante a forma química em que se apresentam no alimento, as interações que sofrem com os restantes constituintes da refeição com que são ingeridos, nomeadamente as interações que sofrem com os fitatos, polifenóis, fibra alimentar, ácido oxálico, proteínas, gordura ou ácido ascórbico, e a forma como se efetua o processamento dos alimentos, nomeadamente com a temperatura.

A tentativa de minorar a carência nutricional em micronutrientes pode passar por diferentes estratégias. Uma dessas estratégias reside na fortificação de produtos alimentares em minerais e vitaminas, de forma a aumentar a sua concentração em micronutrientes. Exemplos desta estratégia são a fortificação do sal de cozinha com iodo (Allen *et al.*, 2006) ou a biofortificação de culturas como, por exemplo, cereais, grãos e tubérculos, realizada através da seleção de genótipos, da aplicação de fertilizantes ou da modificação genética de modo a que se

consigam obter produtos com teor mais elevado em minerais e vitaminas (Bouis, 2002; Nestel *et al.*, 2006 citados por Zhao *et al.*, 2009).

Outra das abordagens para tentar minorar a carência nutricional em micronutrientes passa pela tentativa de aumentar a sua biodisponibilidade. Neste contexto pode referir-se a germinação e a fermentação microbiana como forma de reduzir os teores de fitatos e polifenóis dos cereais não refinados, a adição de ácido ascórbico, conseguida pela adição de frutas, para promover a absorção de ferro não hémico, ou o aquecimento para destruir fatores antinutricionais, tais como, substâncias bociogénicas ou tiaminases que interferem, respetivamente, com a disponibilidade do iodo e da vitamina B₁, ou para ajudar a libertar determinados compostos da matriz do alimento (Gibson *et al.*, 2006). Por exemplo, diversos estudos têm comprovado que o consumo de espinafres, cenoura ou tomate processados termicamente leva a um nível sérico de carotenóides mais elevado do que o que se obtém através do consumo dos mesmos vegetais crus (revisto em Gibson *et al.*, 2006).

Os cereais e os produtos cerealíferos são vistos, do ponto de vista nutricional, como as principais fontes de elementos essenciais na alimentação humana (Cubadda *et al.*, 2009), estimando-se que, nos países ocidentais, contribuam em cerca de 20 a 30% para o total de minerais e oligoelementos benéficos consumidos (Carcea *et al.*, 2007 citado por Cubadda *et al.*, 2009). O pão branco, objecto do presente estudo, é rico em calorias, mas relativamente pobre em vitaminas e minerais. Diversos estudos têm demonstrado esta premissa, que pode em parte ser justificada pelo processo de moagem para a obtenção da farinha, que induz a perda de uma grande parte da camada de aleurona e, por conseguinte, grande parte destes elementos (Oury *et al.*, 2006).

1.1. O pão e a sua importância

O pão é um alimento milenar, segundo Mondal & Datta (2008) o primeiro pão foi feito cerca de 10 mil anos AC, sendo possível que a sua origem tenha resultado da experiência de juntar farinha de trigo com água. Este alimento é considerado em muito países como sendo o alimento mais básico da dieta (Mondal & Datta 2008; Brites *et al.*, 2011), estimando-se que cerca de 50% da energia diária resulte da ingestão de glúcidos provenientes do seu consumo (Brites *et al.*, 2011). No entanto, fatores como a mudança de hábitos alimentares ou o aparecimento de outras opções, como os cereais de pequeno-almoço, têm vindo a provocar uma diminuição do consumo de pão (Dewettinck *et al.*, 2008; Gellynck *et al.*, 2009).

O pão é um alimento com bastantes variações, dependendo do local onde é produzido, forma e técnicas utilizadas na sua produção, no entanto, a sua constituição básica é farinha de cereais, água, sal e um agente de fermentação ou levedura (Martin, 2004; Sluimer, 2005 citados por Gellynck *et al.*, 2009).

1.2. Constituintes principais do pão

1.2.1. Farinha

Por farinha entende-se o produto resultante da moenda de grãos de um ou mais cereais, maduros, sãos, não germinados e isentos de impurezas, bem como da sua mistura (Portaria nº254/2003). A legislação portuguesa, na Portaria nº254/2003, estabelece uma série de especificações para as farinhas destinadas a fins industriais e a usos culinárias que incluem as suas características, rotulagem, acondicionamento, armazenagem, transporte e comercialização. Dentro dessas especificações encontram-se as respetivas características analíticas. Por exemplo, para a farinha de trigo tipo 65 (utilizada no presente estudo) são definidas as características analíticas de humidade (percentagem máxima) de 14,5; acidez (g/100g máximo) de 0,120; cinza total (percentagem limite) 0,61-0,75; cinza insolúvel (percentagem máxima) de 0,02 e glúten seco (percentagem mínima) de 8 (Portaria nº254/2003).

Na obtenção da farinha, os grãos de cereais são sujeitos a vários tipos de processamento, que podem alterar o seu valor nutricional, exemplos disso são a moagem ou a extração de calor (Coudray *et al.*, 2001). A moagem é o processo pelo qual a farinha branca é obtida e apresenta-se como um dos processos que induz mais perdas nutricionais nos grãos (Dewettinck *et al.*, 2008), afetando as concentrações dos elementos inorgânicos (Cubadda *et al.*, 2009).

O trigo é o segundo cereal mais produzido a nível mundial (FAO 2012, citado por Akhter *et al.*, 2012), sendo a sua farinha, especialmente a da variedade de trigo mole (*Triticum aestivum* L.) a mais amplamente utilizada na panificação (Cubadda *et al.*, 2009). A escolha do trigo como o cereal mais utilizado na panificação, prende-se com as excelentes características que confere às massas, no entanto outros cereais podem ser utilizados no fabrico do pão como o centeio (*Secale cereale*), a cevada (*Hordeum vulgare*) a aveia (*Avena sativa*) (Dewettinck *et al.*, 2008) ou o milho (*Zea mays*) (Brites *et al.*, 2011). Para além da sua ampla utilização na panificação, o trigo, é ainda constituinte fundamental na elaboração de muitos outros géneros alimentícios de consumo diário, de que são exemplo, os biscoitos, bolos e massas alimentícias (Scheuer *et al.*, 2011).

1.2.1.1. O trigo na panificação

O grão de trigo pode dividir-se em pericarpo, endosperma e o gérmen (figura 1.1) (Scheuer *et al.*, 2011). O pericarpo constitui a zona mais externa sendo a camada que protege o grão. Esta estrutura é a parte do grão mais rica em polissacáridos não amiláceos (arabinoxilanos, celulose e β -glucanos) e sais minerais (Dewettinck *et al.*, 2008; Scheuer *et al.*, 2011). O endosperma é o constituinte maioritário do grão, apresenta-se como uma matriz proteica onde se encontra o amido (Scheuer *et al.*, 2011). O gérmen, onde se localiza a parte embrionária da planta, é rico em proteínas, lípidos e açúcares redutores (Germani *et al.*, 1993 citado por Miranda, 2006). O endosperma e o gérmen juntos formam a semente e são revestidos pela camada de aleurona rica em fósforo, fitatos, proteínas, lípidos, vitaminas e enzimas (revisto em Miranda 2006).

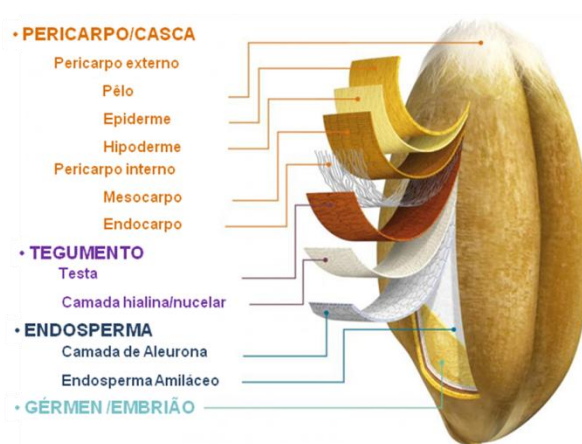


Figura 1.1: Estrutura básica do grão de trigo (Adaptado de <http://www.harinaspolo.com/granotriga.php>).

O processo pelo qual se obtém a farinha de trigo denomina-se por moagem. Neste processo, o endosperma é separado dos restantes constituintes do grão, sendo moído e transformado em farinha. O processo de moagem induz a perda de muitos nutrientes, fundamentalmente fibras, minerais e vitaminas que se encontram nas camadas mais externas do grão (Coudray *et al.*, 2001).

A farinha de trigo é composta por 70 a 75% de amido, 12 a 14% de água, 8 a 16% de proteínas e outros elementos de menor expressão como os polissacarídeos não amiláceos (2 a 3%), lípidos (cerca de 2%) e cinza (aproximadamente 1%), contudo as suas características são diferentes mediante o tipo de cultivar de trigo (Morita *et al.*, 2002 citado por Scheuer *et al.*, 2011). As características únicas que a farinha de trigo apresenta face às farinhas de outros cereais, passam pela sua capacidade de formar massa quando misturada com água e de reter o gás que é produzido durante a fermentação (revisto em Scheuer *et al.*, 2011). Estas duas características estão diretamente relacionadas com o tipo de proteínas existentes neste cereal. Assim, a farinha de trigo apresenta, para além de outras proteínas, gliadinas, proteínas pequenas e globulares que em contato com a água formam uma estrutura viscosa e pegajosa,

e gluteninas, proteínas longas que em contato com a água formam uma estrutura tenaz e elástica (Singh & MacRitchie, 2001 citado por Giannou *et al.*, 2003). Quando amassadas na presença de água estes dois tipos de proteínas, em associação com lípidos e pentosanas insolúveis, formam o glúten, que confere às massas as características de viscosidade e elasticidade e a estrutura reticulada responsável pela retenção do gás (Belitz *et al.*, 2009).

O amido, como parte maioritária da farinha de trigo, desempenha igualmente funções de relevância no pão. Esta macromolécula é produzida nos amiloplastos, e na sua constituição prevalecem os polímeros, amilose, de estrutura linear, e amilopectina, de estrutura ramificada (figura 1.2) (Hoseney, 1991 citado por Scheuer *et al.*, 2011). Durante o fabrico do pão os grânulos de amido absorvem água, incham e perdem a sua forma num processo que se chama de gelatinização. A digestibilidade do amido é rápida no trato gastrointestinal, sendo a amilopectina digerida mais rapidamente do que a amilose. Da digestão do amido resulta a libertação de glucose (Zhao & Shewry 2011).

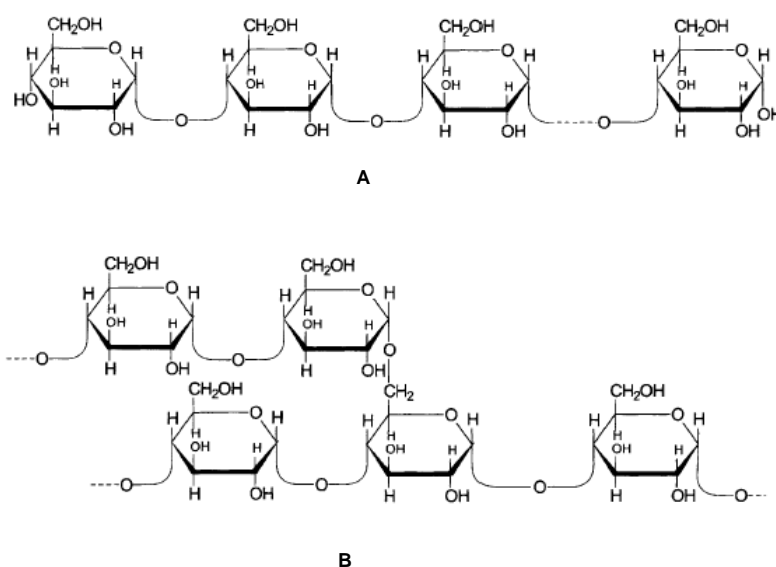


Figura 1.2: (A) Estrutura da amilose e (B) da amilopectina (Coultate, 2002).

O teor em fibra alimentar da farinha de trigo pode variar bastante consoante se trate de uma farinha integral ou de uma farinha branca. Assim, Zhao & Shewry (2011) indicam um valor de 10 a 15% para farinhas de trigo integrais e de cerca de 3% para a farinha de trigo branca. A fração de fibra alimentar corresponde aos já referidos polissacarídeos não amiláceos, como por exemplo, o arabinóxilano (cerca de 70%) e o β -glucano (cerca de 20%) (Bacic & Stone, 1980; Mares & Stone, 1973 citados por Zhao & Shewry 2011).

Nutricionalmente, o trigo é considerado uma fonte importante de minerais como o ferro, zinco, cobre e magnésio (Fan *et al.*, 2008). No entanto, as variedades atuais de trigo parecem

apresentar quantidades de minerais mais baixas do que as variedades antigas (Shewry, 2009). Autores como Fan *et al.* (2008) estudaram esta questão, no seu estudo sobre a evidência do decréscimo da densidade mineral no grão de trigo nos últimos 160 anos, salientando que publicações recentes baseadas em tabelas de composição de alimentos indicam uma redução no conteúdo de minerais e sugerem como causa as práticas de agricultura intensiva que induzem o esgotamento de minerais nos solos. O mesmo estudo refere que desde meados de 1960, as concentrações de ferro, zinco, cobre e magnésio no trigo decresceram significativamente, facto que coincidiu com a introdução de cultivares de alto rendimento.

A diminuição do conteúdo em minerais no grão de trigo pode ser revertida mediante algumas soluções, uma delas apontada por Betschart (1988) citado por Miranda (2006) que defende que com o aumento da utilização de farinha de trigo integral se poderia aumentar o valor nutricional da farinha de trigo. Com efeito, a moagem convencional reduz drasticamente a quantidade de minerais na farinha, dado que as partes do grão mais ricas nestes elementos (a camada de aleurona e o gérmen) são resíduos deste processo, e a parte mais pobre (endosperma amiláceo) é o que efetivamente passa a farinha (Brondi *et al.*, citado por Cubadda *et al.*, 2009). Num estudo em que se avaliou o efeito da moagem, do fabrico e da cozedura de macarrão na composição em cálcio, cobre, ferro, magnésio, fósforo, potássio, selénio e zinco do trigo duro, foi possível verificar que a moagem provocava uma redução significativa da concentração de todos os elementos ($p < 0,01$) face aos originais grãos de trigo, sendo que de todos os minerais, os que apresentaram maiores perdas foram o ferro (63%) o magnésio e zinco com (66%). Já no fabrico da massa não ocorreram alterações significativas, tendo a cozedura provocado perdas baixas dos elementos, afetando essencialmente a concentração de cálcio e de potássio (Cubadda *et al.*, 2009).

Com o aumento da utilização de farinhas integrais seria possível aliar um maior conteúdo em minerais com uma maior quantidade de fibras alimentares e seus benefícios, bem como, com um aumento do conteúdo vitamínico, contudo, a digestibilidade proteica seria menor e aumentavam-se os fatores antinutricionais (fitatos – localizados nas camadas periféricas do grão), influenciando negativamente a biodisponibilidade dos minerais Betschart (1988) citado por Miranda (2006).

Outra possibilidade, mais recentemente sugerida, seria a biofortificação. A biofortificação do trigo pode ser conseguida pela combinação entre a fertilização e o melhoramento genético de forma a maximizar o enriquecimento em micronutrientes (Velu *et al.*, 2013). Estes estudos de biofortificação surgem no sentido de combater as carências em micronutrientes, em especial nas regiões onde a alimentação é feita à base de cereais (Cakmak *et al.*, 2010, Bouis *et al.*, 2011 citados por Velu *et al.*, 2013).

Também a adição de minerais ao pão pode ajudar a combater as deficiências em micronutrientes. Karadzhov & Iserliyska (2003) tentaram fortificar o pão em minerais pela

adição de hidrogenofosfato de cálcio, carbonato de magnésio, sulfato de ferro e cloreto de zinco, concluindo que a nível das características físicas, como a forma, a crosta e a cor do miolo não se verificaram grandes alterações contudo a porosidade do miolo apresentou-se, relativamente ao controlo, mais pobre. Neste estudo, as grandes diferenças foram mesmo obtidas ao nível da análise sensorial, sendo que 22% dos provadores consideraram que a adição dos minerais diminuía a percepção do típico sabor do pão de trigo. Assim, o sabor do pão fortificado foi substancialmente diferente do sabor do pão sem os elementos fortificantes. Foram referidos por estes autores, outros estudos mais antigos, nomeadamente o de Emodi (1980), o de Ranhotra *et al.* (1976) e o de Salovaara (1982), onde a adição dos elementos fortificantes conduziu, igualmente, a algumas alterações negativas ao nível do sabor e do aroma do pão.

1.2.2. Água

A água é um ingrediente indispensável na formação da massa, isto porque, para além de ser um solvente, hidrata as proteínas da farinha, tornando possível a formação do glúten. Possui igualmente uma função plastificante, participando na gelatinização do amido durante a cozedura (Canella-Rawls, 2003). Para além das funções já referidas, a água também fornece um meio adequado à ocorrência da fermentação (Vitti, 2001 citado por Martinbianco, 2011). Este ingrediente é utilizado na formulação do pão em quantidades que rondam os 50 a 60% (Philippi, 2003 e Canella-Rawls, 2003 citados por Sousa, 2012). Na massa, a água distribui-se ficando cerca de 46% associada com o amido, 31% com as proteínas e 23% com as pentosanas (Pomeranz, 1992). A quantidade de água utilizada na formulação contribui para a consistência da massa, sendo que uma baixa quantidade de água produz uma massa mais seca e um miolo mais macio, enquanto que água em excesso garante uma massa mais extensível, um pão com alvéolos irregulares e com uma textura mais semelhante a borracha (DiMuzio, 2010).

Para além da referida influência ao nível da textura, nomeadamente da suavidade do miolo e do crocante da crosta, o conteúdo de água e a sua distribuição determina igualmente o tempo de vida do pão, devido a influenciar o crescimento microbológico (Pomeranz, 1992).

1.2.3. Sal

O “sal alimentar” é o produto cristalino de extração no estado natural (tal qual) ou tratado, essencialmente constituído por cloreto de sódio, num mínimo de 90% do produto seco que se destina ao consumo humano, ao uso em indústrias alimentares e como matéria-prima de indústrias higienizadoras ou transformadoras de sal para fins alimentares (Lei nº75/2009). A portaria nº72/2008 de 23 Janeiro acrescenta, que o sal alimentar tal qual destinado ao consumo direto na alimentação humana, é aquele que provém exclusivamente de salinas de

traçado tradicional, com características especificadas e produzido nas condições, descritas nesta portaria.

O sal é um dos constituintes básicos na formulação do pão, encontrando-se em Portugal devidamente legislada a sua utilização. Este constituinte é adicionado para conferir sabor, desempenhando ainda, funções bactericidas, por diminuição da atividade da água promovendo, assim, uma redução da deterioração do produto acabado e de controlo do crescimento da levedura, promovendo uma menor libertação de gás devido a inibir a atividade da levedura durante a fermentação (Belz *et al.*, 2012). Para além destas funções, o sal contribui, ainda, para a melhoria da textura do produto final ao promover o desenvolvimento das estruturas do glúten durante a mistura da massa (Belz *et al.*, 2012).

Dewettinck *et al.* (2008), citados por Plácido *et al.*, 2012 indicam o pão como o alimento que mais contribui para a ingestão diária total de sal. Deste modo, e conhecendo os efeitos negativos que o consumo excessivo de sal acarreta para a saúde humana, tem vindo a ser desenvolvido um esforço no sentido de se conseguir reduzir a quantidade de sal adicionado aos alimentos processados e, em particular, aos produtos de panificação. Contudo, no caso concreto destes produtos, a redução do sal afeta não só o sabor mas também a qualidade final do produto. No ano de 2009 surgiu em Portugal uma lei, Lei nº75/2009 de 12 de Agosto, visando estabelecer normas relativas à redução do teor de sal no pão bem como de informação na rotulagem dos alimentos embalados destinados ao consumo humano. Na referida lei ficou estabelecido que o teor máximo de sal permitido no pão, após confeção é de 1,4 g por 100g de pão (ou seja 14g de sal por quilograma de pão ou o correspondente 0,55g de sódio por 100g de pão). Ficando excluídos desta norma os tipos de pão reconhecidos como produtos tradicionais com nomes protegidos.

1.2.4. Levedura

A levedura é o agente na formulação do pão responsável pela fermentação, sendo que a fermentação é a etapa determinante para a textura e características organolépticas do pão (Pyler & Gorton, 2008). Na panificação a levedura mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, que metaboliza os açúcares fermentescíveis em condições anaeróbias (glucose, fructose, sacarose e maltose) (Giannou *et al.*, 2003) para obtenção de energia, produzindo dióxido de carbono e etanol (DiMuzio, 2010), participando na obtenção dos compostos aromáticos (Araújo *et al.*, 2008 citado por Sousa, 2012). O dióxido de carbono contribui para a expansão da massa influenciando a textura final do pão (Canella-Rawls, 2005 citado por Piekarski, 2009), sendo o etanol eliminado durante a cozedura.

A levedura fresca, que foi a utilizada neste estudo, é a mais utilizada na panificação, possuindo na sua composição células de levedura e amido requerendo um acondicionamento sob refrigeração.

1.3. O Processo de Panificação

O fabrico do pão engloba três etapas, a etapa de mistura dos ingredientes, a etapa da fermentação e, por fim, a etapa onde ocorre a cozedura. Durante todo o processo (Dewettinck *et al.*, 2008), bem como durante o armazenamento (Giannou *et al.*, 2003) ocorre um largo número de reações que vão induzir alterações nos constituintes nutricionais do pão.

1.3.1. Mistura

A fase de mistura, é a primeira fase do fabrico de pão, é nesta fase que se juntam e misturam os ingredientes da receita, durante um certo período de tempo. O objetivo é a obtenção de uma mistura praticamente homogénea, para que se desenvolva a rede de glúten. Primeiramente as proteínas são hidratadas e seguidamente começam a interagir entre si e com outros elementos como os lípidos, os sais, os polissacáridos não amiláceos e o amido na formação da rede de glúten (Giannou *et al.*, 2003). Em primeira instância esta fase é responsável pela mistura dos ingredientes, também lhe cabe a função de hidratar os componentes da farinha e o desenvolvimento da matriz formando uma massa lisa e elástica capaz de se expandir e efetuar a retenção de gás produzido posteriormente pela ação da levedura. Nesta fase ocorre a incorporação de ar na massa sob a forma de bolhas que vão constituir a base da estrutura do miolo (Bloksma, 1990, citado por Ktenioudaki *et al.*, 2013). O tempo de mistura pode determinar o tipo de massa que é obtida em termos reológicos e estruturais. Assim, mais tempo de mistura pode originar uma massa mais leve e menos consistente devido à quebra das ligações dissulfeto durante a despolimerização que ocorre durante esta fase (Gómez *et al.*, 2011).

A incorporação da água e de oxigénio na massa, que ocorre durante a mistura, pode afetar os componentes fitoquímicos presentes na farinha, dado que são ativadas as enzimas oxidativas das farinhas que podem afetar compostos como os fenóis, os carotenóides entre outros (Ktenioudaki *et al.* 2013). A enzima lipooxigenase, presente na farinha de trigo, usa o oxigénio da fase de mistura para efetuar a oxidação dos ácidos linoleico, linolénico e dos carotenóides que podem sofrer uma perda significativa após esta fase do fabrico do pão (Hidalgo & Brandolini, 2010, Leenhardt *et al.*, 2006 citados por Ktenioudaki *et al.*, 2013). A oxidação dos carotenóides origina um branqueamento da farinha e a obtenção de pão mais branco (Belitz *et al.*, 2009).

1.3.2. Fermentação

A fase de fermentação inicia-se logo após a mistura dos ingredientes com um período de descanso da massa, no qual ela cresce e adquire as condições ótimas para a fase seguinte de cozedura (Ktenioudaki *et al.*, 2013). Os principais objetivos desta fase são a produção de gás

(dióxido de carbono), a complementação do desenvolvimento do glúten e a produção de sabor e aroma na massa do pão (Guerreiro, 2006). O dióxido de carbono produzido pelas leveduras no decurso da fermentação é difundido pela massa ficando aprisionado na estrutura reticulada do glúten que se formou durante a fase anterior de mistura (Sluimer, 2005, citado por Ktenioudaki *et al.*, 2013).

Outro dos processos que ocorre durante a fase de fermentação é a metabolização dos açúcares pela ação das bactérias lácticas e acéticas da farinha traduzindo um aumento da acidez da massa. Nesta fase ocorrem também alterações a nível das proteínas, que resultam da presença de enzimas proteolíticas das leveduras. As proteases quebram as cadeias proteicas originando péptidos menores e estes vão ser utilizados como alimento para as leveduras, as peptidases convertem os péptidos em aminoácidos que vão contribuir para o aroma e sabor da massa. Esta diminuição de cadeias proteicas vai favorecer a interação entre elas e o desenvolvimento da rede de glúten (Guerreiro, 2006).

Durante a fermentação da massa pode ocorrer a hidrólise do fitato, contudo se for adicionado um fortificante de cálcio a atividade da fitase da levedura é inibida. São também produzidos, nesta fase, alguns ácidos orgânicos que podem formar ligandos solúveis, potenciando a absorção de ferro e zinco. Estes ácidos orgânicos podem também formar complexos com minerais ligados aos fitatos, favorecendo a sua hidrólise pela fitase (revisto em Gibson *et al.*, 2006).

1.3.3. Cozedura

Logo nos primeiros minutos da cozedura verifica-se o aumento do volume massa. Este aumento resulta, por um lado, da levedura se tornar mais ativa por um período curto de tempo com o aumento de temperatura, produzindo mais dióxido de carbono e, por outro lado, da expansão que o gás sofre devido ao aumento da temperatura e à passagem a vapor da água interna da massa. Quando a temperatura atinge valores próximos dos 60°C, a levedura termina a sua atuação e começa o processo de gelatinização do amido (Ronayne *et al.*, 2009). Aos 70°C ocorre a desnaturação proteica, a rede de glúten desnatura ou coagula forma-se então uma estrutura rígida e porosa. Neste processo ocorre a libertação de água (Guerreiro, 2006).

A gelatinização do amido refere-se, de uma forma geral, à perda da organização estrutural e cristalina dos grânulos de amido, que ocorre mediante a ação da temperatura e humidade adequadas. Basicamente os grânulos absorvem a água inchando e destruindo irreversivelmente a sua estrutura (Copeland *et al.* 2009). As cadeias lineares de amilose migram para o exterior dos grânulos, formando em contato com a água redes gelatinosas em redor dos amiloplastos. A gelatinização do amido aumenta a sua digestibilidade (Ronayne *et al.* 2009).

O processo de cozedura do pão ocorre acima dos 200 °C. Estão associadas a esta etapa várias reações químicas como as reações de Maillard e de caramelização (Hidalgo & Brandolini 2011). As reações de Maillard aumentam a capacidade antioxidante no produto cozido com especial atenção nos componentes da crosta quando comparados com o miolo. O processo de cozedura não parece afetar os compostos fenólicos mas parece ser responsável por perdas na ordem dos 15 a 20% de vitaminas do grupo B e de 50% no caso específico da tiamina (revisto em Ronayne *et al.*, 2009 e Ktenioudaki *et al.*, 2013).

É igualmente de realçar neste ponto que os minerais não podem ser destruídos pela ação do calor, luz, agentes oxidantes, valores de pH, devido a não serem nutrientes orgânicos como as vitaminas e aminoácidos. Contudo, podem ser removidos dos alimentos por lixiviação ou separação física, e claro como já foi referido a sua biodisponibilidade pode ser afetada por alguns fatores que ditam a sua absorção (Miller, 2008).

1.3.4. Armazenamento

O processo de armazenamento também se apresenta com um processo importante para a qualidade do pão. O pão fresco é um produto com um tempo de prateleira curto e durante o seu armazenamento ocorrem inúmeras alterações físicas e químicas, de referir o envelhecimento, onde a qualidade do pão diminui ocorrendo perdas de frescura e de aroma bem como das propriedades crocantes tornando-se o pão rígido (Giannou *et al.*, 2003). Um dos fenómenos que acontece nesta fase é a retrogradação do amido, que envolve a amilose e a amilopectina, sendo que a primeira sofre retrogradação muito mais rapidamente (minutos a horas) do que a segunda (de horas a dias) (Copeland *et al.* 2009). Na retrogradação do amido as moléculas de amilose encontram-se associadas e imobilizadas num firme gel, enquanto que a amilopectina começa a entrelaçar-se e através das suas ramificações associa-se, diminuindo a flexibilidade do gel e levando a um endurecimento do miolo (Guerreiro, 2006). Este processo está estritamente ligado ao envelhecimento do pão, devido à transição do amido amorfo a um amido parcialmente cristalino que sofreu retrogradação (Damodaran *et al.*, 2008).

1.4. Aditivos alimentares utilizados na Panificação

As necessidades atuais, como a produção a larga escala, a exigência de qualidade por parte dos consumidores e a necessidade de aumentar o tempo de vida de prateleira dos alimentos, conduziu ao recurso a aditivos alimentares, como os emulsionantes, os conservantes ou o antioxidantes (Stampfli & Nersten, 1995, citados por Mondal & Datta, 2008). O pão não foi exceção e, actualmente, são vulgarmente utilizados aditivos alimentares, que facilitam o processo de panificação e permitem a obtenção de pães muito mais atrativos tanto a nível visual, como a nível de textura e de durabilidade e com melhoradas características organolépticas.

Os aditivos devido às quantidades utilizadas (ppm) incluem-se na categoria dos micro-ingredientes do pão. São tipicamente utilizados entre os 0,1% ou por vezes até menos até aos 5%. Devido às pequenas quantidades e à dificuldade de manuseamento, são normalmente combinados com mais aditivos, nas quantidades recomendadas (Pyler & Gorton, 2008). Alguns deles são adicionados diretamente à farinha, de salientar os agentes de oxidação e os fortificantes, através de equipamentos específicos que permitem que o ingrediente seja adicionado mediante uma velocidade controlada, conseguindo-se, desta forma, a precisão necessária para adicionar estes elementos (Pyler & Gorton, 2008).

Para o presente estudo realçam-se os emulsionantes e os oxidantes, uma vez que os aditivos utilizados são destas categorias. As moléculas que constituem os emulsionantes possuem uma parte hidrofílica (polar solúvel em água) e uma parte hidrofóbica (apolar e insolúvel em água), proporcionam a emulsão de substâncias imiscíveis, fornecem lubrificação à massa para o seu tratamento mecânico, substituem parcialmente a adição de gordura, interagem com o glúten, originam pães com um volume maior e uma melhor textura (Brandão & Lira, 2011). Os oxidantes utilizados na panificação atuam ao nível da formação do glúten (Brandão & Lira 2011), permitindo um maior número de ligações dissulfeto (-S-S-) entre os resíduos de cisteína das proteínas do glúten, aumentando a tolerância à mistura e a capacidade de retenção de gases durante a fermentação (Guerreiro, 2006).

1.4.1. Ácido Ascórbico (E300)

O ácido ascórbico (vitamina C), ocorre naturalmente em muitos frutos e legumes podendo ser produzido comercialmente por síntese biológica ou química. Consta na lista de aditivos alimentares da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) como E300 e é incluído na categoria de antioxidantes. Possui várias aplicações como antioxidante em soluções aquosas e emulsões lipídicas, evita o escurecimento de frutos e sumos, é preservante da cor da carne e de salientar neste estudo a sua função como melhorante na farinha (<http://www.asae.pt/pagina.aspx?f=3&back=1&id=8112&back=1&chave=aditivos&tema=&avance=%29>, consultado a 14/04/2014).

O ácido ascórbico é amplamente utilizado na panificação como melhorante na farinha e também como oxidante, segundo El-Hady *et al.* (1996), Fitchett & Frazier (1987) e Stear (1990) citados por Lopes *et al.* (2007) a quantidade recomendada deste aditivo para a obtenção de um bom desempenho no processamento da massa varia entre 10 e 200 mg.kg⁻¹ em relação ao peso da farinha, sendo o seu teor máximo específico na União Europeia de *quantum satis*, o que significa que não é especificado qualquer teor máximo, sendo, no entanto, os aditivos utilizados de acordo com as boas práticas de fabrico, em quantidade não superior à necessária para a obtenção do resultado pretendido e desde que não induzam em erro o consumidor (Decreto-Lei n.º 121/98; Regulamento (UE) N.º 1129/2011). As suas funções quando utilizado no pão assentam primeiramente na produção de uma rede de glúten mais estável, mais forte e

mais elástica, capaz de se expandir sem ruturas durante o crescimento rápido na fase inicial da cozedura (Williams & Pullen, 2007). O ácido ascórbico quimicamente é um agente redutor e para que funcione como agente oxidante na massa tem que ele mesmo que se oxidar a ácido dehidroascórbico (Collins, 1994, citado por Williams & Pullen, 2007). Esta oxidação ocorre durante a mistura pela ação da enzima ácido ascórbico oxidase que existe na farinha, numa reação em que participa o oxigénio existente na massa.

Existem duas teorias para explicar o efeito melhorante do ácido ascórbico. Na primeira delas, o ácido dehidroascórbico oxida os grupos tiol das proteínas do glúten promovendo o estabelecimento de ligações -S-S- entre estes. Uma vez que o oxigénio é necessário para este processo, o ácido ascórbico perde a atividade rapidamente após a fase da mistura. Na segunda teoria a ação do ácido ascórbico resulta de uma reação em cadeia que leva à rápida remoção da glutathione endógena da farinha. A glutathione na forma reduzida pode ligar-se aos grupos tiol das proteínas do glúten diminuindo as possibilidades destes estabelecerem pontes de enxofre entre si, causando assim um enfraquecimento da massa (Leyn, 2006).

A comparação entre o efeito melhorante do ácido ascórbico e de outro agente oxidante, a azodiicarbonamida, mostrou que o ácido ascórbico foi quem mais influenciou o volume específico do pão francês (Lopes *et al.*, 2007). Para além da função melhorante da farinha, o ácido ascórbico, confere melhores características organoléticas ao pão, tornando a porosidade do miolo e a cor mais uniformes (Sousa, 2012).

1.4.2. Lecitina (E322)

A lecitina encontra-se na lista de aditivos alimentares da ASAE no grupo dos antioxidantes (E 322). O termo lecitina abrange um grupo complexo de fosfolípidos de colina de presente em plantas e animais e geralmente obtido de sementes de soja, amendoim e milho ou de gema de ovo, sendo utilizado como emulsionante, estabilizador, antioxidante e espessante (<http://www.asae.pt/pagina.aspx?f=3&back=1&id=8112&back=1&chave=aditivos&tema=&avance=%29>, consultado a 14/04/2014). Muito embora esteja no grupo dos antioxidantes, na bibliografia consultada relativa à panificação, é comum ser referido como um emulsionante, devido a ser essa a sua aplicação nesta área. Stampfli & Nersten (1995) citam autores como Schaefer (1988), Schmitt (1992), Ziegelitz (1992) e Silva (1993) que descreveram as suas propriedades como emulsionante natural.

A fonte de lecitina mais usada na panificação é a soja. Esta lecitina apresenta-se como um líquido viscoso composto aproximadamente por 65% de fosfolípidos e 35% de óleo de soja e possui a capacidade de aumentar a capacidade de retenção de gás (não tão relevante quanto outros aditivos), conferindo ao pão uma crosta densa que protege as qualidades crocantes durante mais tempo (Williams & Pullen, 2007). Nas massas de trigo levedadas, a lecitina

aumenta a expansibilidade do glúten, originando um melhor processamento da massa, promove uma fermentação mais estável, induzindo no produto final um maior volume e uma textura mais uniforme (Bueschelberger, 2004).

A ação da lecitina parece relacionar-se com a formação de camadas bimoleculares entre os fosfolípidos e as proteínas do glúten, com estabelecimento de ligações entre os grupos ácidos dos fosfolípidos e os grupos básicos das proteínas, e ainda da formação de complexos entre as lecitinas hidrolisadas e a hélice α da amilose impedindo a retrogradação do amido, prologando, assim, a frescura do pão (Bueschelberger, 2004). A quantidade de lecitina utilizada na panificação é, geralmente, de 0,3% em relação ao peso da farinha (Santos 2008, citado por Sousa, 2012), sendo o seu teor máximo específico na União Europeia de *quantum satis* (Regulamento (UE) N.º 1129/2011).

1.4.3. Mono e diglicéridos de ácidos gordos (E471)

Os mono e diglicéridos de ácidos gordos (E471) são produtos normais da digestão das gorduras, sendo que quimicamente são obtidos a partir do glicerol e de ácidos gordos. São usados de uma forma geral como solventes, lubrificantes, melhoradores de textura, estabilizadores e agentes de revestimento (<http://www.asae.pt/pagina.aspx?f=3&back=1&id=8112&back=1&chave=aditivos&tema=&avance=%29>, consultado a 14/04/2014).

O E471 é um emulsionante, ou seja é uma substância gorda com propriedades hidrofílicas e lipofílicas, com a capacidade de reduzir a tensão ativa que existe entre duas fases imiscíveis, conseguindo formar uma emulsão (Dziezak, 1988, Flack, 1987 e Krog, 1981 citados por Stampfli & Nersten, 1995). O seu uso na panificação resulta na obtenção de um miolo mais macio até três dias após cozedura, devido ao abrandamento da retrogradação do amido durante o arrefecimento e armazenamento. Este abrandamento resulta de a temperaturas elevadas, este aditivo criar ligações com a amilose do amido de trigo e traduz-se por uma maior vida de prateleira (Williams & Pullen, 2007).

Na panificação, os emulsionantes atuam, na melhoria da manipulação da massa, na taxa de hidratação e absorção de água e na maior tolerância ao tempo de repouso, choque e fermentação. Este tipo de aditivo melhora a estrutura do miolo e espessura da crosta induzindo também melhorias no corte. Os emulsionantes conduzem a uma diminuição do uso de gorduras, uma vez que promovem o aumento do volume do pão. O seu poder de retenção de gás leva à redução das necessidades de fermento e a um maior crescimento no forno, resultando em pães com maiores volumes (revisto em Stampfli & Nersten, 1995). No que diz respeito às quantidades utilizadas deste aditivo, Williams & Pullen (2007), consideram que 1% do peso da farinha é suficiente para adquirir maior tempo de prateleira, tendo como referência

o pão branco standart (800g) no Reino Unido, sendo o seu teor máximo específico na União Europeia de *quantum satis* (Regulamento 1129/2011).

1.4.4. Ésteres monoacetiltartáricos e diacetiltartáricos de mono e diglicéridos de ácidos gordos (E472e)

Os ésteres monoacetiltartáricos e diacetiltartáricos de mono e diglicéridos de ácidos gordos (E472e) encontram no grupo dos emulsionantes, estabilizadores, espessantes e gelificantes na lista de aditivos da ASAE, podendo também actuar como sequestrantes (Lidon & Silvestre, 2008). Podem ser denominados por éster DATA ou simplesmente por DATEM, dado que este termo cobre uma gama de materiais semelhantes em que o que varia é a natureza do ácido gordo e a proporção do monoglicérido (Williams & Pullen, 2007). Na panificação são utilizados para fortalecer a massa, formando pontes de hidrogénio com o amido e induzem à agregação das proteínas do glúten pela sua ligação às porções hidrofóbicas (Kohajdová *et al.*, 2009, citados por Sousa, 2012).

Segundo Gaupp & Adams (2004), este aditivo provoca um aumento da temperatura a que ocorre a gelatinização do amido num mecanismo que é influenciado pela concentração de iões. O E472e forma complexos com o amido, podendo estes ocorrer a nível superficial no amido ou como compostos de inclusão entre amido/emulsionantes, sendo a sua formação dependente da temperatura, concentração e estrutura física do emulsionante (Krog 1970, citado por Gaupp & Adams, 2004). Os ésteres DATA quando adicionados às massas ligam-se de forma muito rápida aos fios de glúten hidratados, formando uma rede mais forte, mais extensível e mais resiliente (Williams & Pullen, 2007). Sendo emulsionantes iónicos formam pontes de hidrogénio com os grupos amídicos das proteínas do glúten, orientando as suas partes hidrofóbicas para as cadeias não polares das proteínas (Gaupp & Adams, 2004).

Os resultados da aplicação deste aditivo são um aumento da retenção de gás aquando da sua incorporação em massa de farinha de trigo levedada, existindo um nível de adição que maximiza a sua atuação. Uma vez atingido esse máximo alcança-se um plateau após o qual ocorre um decréscimo significativo (Williams & Pullen, 2007). A ação deste aditivo não é influenciada pela presença de gordura (Gaupp & Adams, 2004). A quantidade de E472e geralmente utilizada na panificação é de 0,3% do peso da farinha (Sousa, 2012; Williams & Pullen, 2007), sendo o seu teor máximo específico na União Europeia de *quantum satis* (Regulamento 1129/2011).

1.5. Composição nutricional do pão

Os cereais fazem parte de uma dieta equilibrada, fornecendo nutrientes de todos os grupos da pirâmide alimentar, possuindo um alto teor de amido, responsável pelo fornecimento de energia, e de proteínas (Klopfenstein, 2000, citado por Gellynck *et al.*, 2009).

O pão, sendo um produto derivado dos cereais, é igualmente rico em amido e faz parte de uma dieta equilibrada, apresentando na Europa ocidental um consumo estável (Fob 2007, citado por Gellynck *et al.*, 2009). Apesar de ser rico em amido, o pão não fornece somente energia ao organismo sendo ainda uma fonte de outros nutrientes importantes, como proteína, fibra, vitaminas do complexo B e minerais (Isserliyska *et al.*, 2001). A composição do pão depende, entre outros fatores, do tipo de farinha e do seu grau de branqueamento. Nas tabelas 1.1, 1.2 e 1.3 encontra-se a composição aproximada em macronutrientes (tabela 1.1) e vitaminas (tabela 1.2) e minerais (tabela 1.3) do pão trigo e do pão de trigo integral, segundo a Tabela da Composição dos Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. A observação das tabelas permite verificar um maior teor em fibra, vitaminas e minerais do pão integral e um teor mais elevado em proteína e amido do pão branco.

Tabela 1.1: Composição em macronutrientes (valores por 100g de pão) do pão de trigo (Martins, 2007).

| | Energia (kcal) | Proteína (g) | Gordura total (g) | Hidratos de carbono totais (g) | Amido (g) | Fibra (g) |
|------------------------------|-------------------|-----------------|----------------------|-----------------------------------|--------------|--------------|
| Pão de trigo | 289 | 8,4 | 2,2 | 57,3 | 55,2 | 3,8 |
| Pão de trigo integral | 221 | 7,6 | 3,0 | 39,9 | 37,7 | 7,4 |

Tabela 1.2: Composição em vitaminas (valores por 100g de pão) do pão de trigo (Martins, 2007).

| | Vitamina E (mg) | Tiamina (mg) | Riboflavina (mg) | Niacina (mg) | Vitamina B6 (mg) | Folatos (µg) |
|------------------------------|--------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Pão de trigo | 0 | 0,04 | 0,20 | 1,3 | 0,07 | 29 |
| Pão de trigo integral | 0,20 | 0,14 | 0,17 | 2,5 | 0,10 | 32 |

Tabela 1.3: Composição em minerais (valores em mg 100g de pão) do pão de trigo (Martins, 2007).

| | Na | K | Ca | P | Mg | Fe | Zn |
|------------------------------|-----|-----|----|-----|----|-----|-----|
| Pão de trigo | 610 | 121 | 43 | 162 | 31 | 2,2 | 1,0 |
| Pão de trigo integral | 496 | 219 | 55 | 245 | 93 | 3,0 | 2,0 |

1.6. Minerais no pão

1.6.1. Ferro

O ferro encontra-se tanto nas células animais como vegetais, pelo que se encontra em todos os alimentos (Germano & Canniatti-Brazaca, 2002). As melhores fontes alimentares deste mineral são as carnes, em especial o fígado (Almeida & Afonso, 1997). Embora, as carnes sejam alimentos ricos em ferro, existem variações mediante o tipo de carne. Assim, a carne bovina é a mais rica com cerca de 0,019 mg/g, seguida pela carne de galinha com 0,012 mg/g e pela de porco, que apresenta um teor em ferro semelhante ao do atum de cerca de 0,009 mg/g (Kohlmeier, 2003). Nos alimentos o ferro pode apresentar-se em dois estados de oxidação, o férrico (Fe^{3+}) e o ferroso (Fe^{2+}), podendo ainda encontrar-se na forma heme, nas carnes e peixe, ou não-heme, nos ovos, cereais, fruta e legumes (Wolber *et al.*, 2013).

O ferro é um componente essencial de muitas enzimas envolvidas em reações redox devido à facilidade como cede e aceita eletrões nas condições fisiológicas. No Homem mais de metade do ferro encontra-se ligado à hemoglobina, encontrando-se, por isso, envolvido no transporte do oxigénio para as células (Clemens, 2014). Este mineral é um importante co-factor no metabolismo dos lípidos, do álcool, da vitamina A e de outras reações de oxidação-redução (Kohlmeier, 2003), sendo que, a sua deficiência no organismo interfere negativamente na atividade de algumas enzimas envolvidas nestas reações (Germano & Canniatti-Brazaca, 2002). Uma das primeiras consequências da carência de ferro é a anemia, que quando ocorre na infância pode levar a perturbações no desenvolvimento cognitivo (Clemens, 2014).

O ferro heme possui uma boa absorção sendo que 15 a 35% é absorvido após as refeições, é pouco influenciado pela condição do indivíduo em ferro e pelos fatores dietéticos (Gibson *et al.*, 1997 citados por Wolber *et al.*, 2013). Em oposição, o ferro não-heme possui um nível de absorção mais baixa de 2 a 20% (Gibson *et al.*, 1997 citados por Wolber *et al.*, 2013), sendo fortemente influenciado pelos fatores dietéticos e pela condição do indivíduo em ferro, aumentando a absorção nos estados de deficiência (Hallberg, 2002 citado por Wolber *et al.*, 2013).

A absorção do ferro ocorre ao nível do intestino na zona proximal, através de transportadores específicos (Bouhallab & Bouglé in Gaucheron, 2003). O ferro heme parece ser absorvido de forma intacta através de um transportador específico a *heme carrier protein 1*. Uma vez no interior dos enterócitos o grupo heme é degradado pela heme oxigenase e é libertado o ferro na forma de ião Fe^{2+} (Wolber *et al.*, 2013). Na forma ferrosa, o ferro é transportado para o interior dos enterócitos pelos transportadores de iões metálicos divalentes (Bouhallab & Bouglé in Gaucheron, 2003), já quando se encontra na forma férrica é absorvido com recurso a diversas proteínas entre as quais a β -3-integrina, presente na membrana apical dos

enterócitos, e a mobilferrina, existente no citoplasma dos enterócitos, que se associa a outras proteínas para formar um complexo que se designa por paraferitina (Wolber *et al.*, 2013). No entanto, a absorção da forma oxidada Fe^{3+} é baixa devido à sua baixa solubilidade a valores de pH neutro ou alcalino (revisto em Kohlmeier, 2003), assim, o Fe^{3+} é libertado da matriz alimentar no estômago ficando numa forma solúvel a pH ácido, contudo, no pH duodenal o ferro férrico forma complexos insolúveis (hidróxido férrico) o que dificulta a sua absorção (Bouhallab & Bouglé in Gaucheron, 2003).

Dependendo das necessidades do organismo o ferro pode ser libertado dos enterócitos para o sangue, onde circula ligado à transferrina, ou ficar armazenado no enterócito sob a forma de ferritina (revisto em Wolber *et al.*, 2013). No que respeita às perdas de ferro estas ocorrem pela biliar, pela pele e pela urina. Nas mulheres é de referir perdas importantes de ferro durante o sangramento menstrual (Kohlmeier, 2003).

O pão é um dos alimentos passíveis de ser fortificado em ferro, através da fortificação das farinhas. As formas de ferro que podem ser usadas como fortificante em alimentos são o sulfato ferroso, fumarato ferroso e o ferro complexado com o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Germani *et al.*, 2001).

1.6.2. Cálcio

São boas fontes de cálcio o leite e derivados, frutos secos e gordos e alguns produtos hortícolas, destacando-se, neste caso, os espinafres (Almeida & Afonso, 1997). Contudo os alimentos de origem vegetal possuem baixos conteúdos deste mineral. O leite e o iogurte possuem cerca de 1mg/mL de cálcio, já nos queijos as quantidades rondam os 7mg/g (Kohlmeier, 2003).

O cálcio é fundamental para o metabolismo intracelular, para o crescimento ósseo, para a coagulação sanguínea, contração muscular, funções cardíacas (Bass & Chan, 2006), sendo imprescindível a nível intracelular desempenhando, entre outras, funções na sinalização hormonal, na regulação do crescimento e diferenciação celular (Kohlmeier, 2003). As necessidades de cálcio no organismo estão dependentes de alguns fatores nutricionais, ou seja, alguns nutrientes influenciam a absorção e excreção de cálcio. Dentro destes nutrientes são de referir o sódio, a proteína animal e a vitamina D. No caso do sódio e da proteína animal as necessidades de cálcio aumentam pela sua contribuição para o aumento da excreção de cálcio na urina, a vitamina D pela sua participação na homeostase do cálcio e sua absorção (FAO, 2001). A deficiência neste mineral condiciona fortemente o crescimento ósseo e a mineralização (em crianças e jovens) estando associada ao aparecimento da osteoporose nos adultos. As ingestões em excesso de cálcio provocam o risco da ocorrência de pedra renal (Kohlmeier, 2003).

A glândula paratiróide, a vitamina D e a calcitonina interagindo em conjunto são as responsáveis pela manutenção dos níveis de cálcio, participando também na sua absorção, reabsorção renal e excreção (Bass & Chan, 2006). O cálcio que é ingerido mistura-se com o cálcio presente no suco digestivo na zona proximal do intestino delgado onde é absorvido, por transporte ativo (quando a concentração ingerida é baixa) e por difusão simples passiva (quando se trata de altas concentrações ingeridas) (Kohlmeier, 2003; FAO, 2001). A sua absorção ocorre na sua forma solúvel geralmente ionizada como Ca^{2+} (Bouhallab & Bouglé in Gaucheron, 2003). Em meio ácido, o cálcio solubiliza, esta solubilização ocorre no estômago onde os valores de pH se situam entre 1 e 2, o cálcio quebra as suas ligações com os grupos carboxilo ou amino das proteínas e com grupos quelados em cofatores ou enzimas (Cater, 1992 citado por Grüdtner *et al.*, 1997). Já em meio alcalino (intestino delgado) o cálcio precipita muito devido ao aumento da formação do fosfato de cálcio que é excretado pelas fezes, sendo que o fosfato vai aumentando ao longo do intestino à medida que vai aumentando o pH (Turnberg & Riley 1993 citado por Grüdtner *et al.* 1997). Daí cerca de 15 a 70% do cálcio é absorvido no intestino delgado, na zona proximal através dos canais das suas microvilosidades e também pelos próprios canais epiteliais de cálcio. Segundo Lidon & Silvestre, 2010 a absorção de cálcio ocorre em todo o intestino, sendo que é o duodeno e o jejuno que induzem a movimentação do cálcio contra um gradiente de concentração.

Os iões de cálcio circulam no sangue ligados a proteínas (40% com ligação à albumina), complexados com citrato (10%), bicarbonato ou com o fosfato, ou na forma ionizada Ca^{2+} (50%). O cálcio que não é absorvido é excretado nas fezes, bem como na urina e pelo suor (Kohlmeier, 2003). O cálcio que é excretado nas fezes corresponde à fração de cálcio ingerido que não foi absorvida e à fração do cálcio do suco digestivo que não foi reabsorvido (FAO, 2001). Os fortificantes de cálcio mais utilizados são o carbonato de cálcio, o acetato de cálcio e o monofosfato de cálcio (Gomes da Costa, 2011).

1.6.3. Zinco

São boas fontes de zinco as ostras, mariscos (ex. amêijoas cozinhadas 2,7 mg/100g) e carnes (2-3mg/100g) (Kohlmeier, 2003), já os alimentos vegetais são pobres neste metal. As principais funções do zinco incluem a regulação da atividade de algumas metaloenzimas, a participação na manutenção e estrutura das biomembranas, devido à inibição dos danos oxidativos originados pela ligação a locais que podem ser ocupados por metais com poder redox (House, 1999 citado por Khouzam *et al.*, 2011), a participação na ativação de inúmeros genes desempenhando o papel cofator de muitas reações enzimáticas (Kohlmeier, 2003).

A deficiência deste mineral no organismo manifesta-se com a perda do apetite, a escamação da pele, debilitação do sistema imunitário (Kohlmeier, 2003), atrasos no crescimento das crianças, imaturidade sexual e diminuição da acuidade visual, olfativa e gustativa (Almeida &

Afonso, 1997). As ingestões em excesso de zinco provocam efeitos adversos no organismo, como exemplos, a supressão da resposta imune, a diminuição da lipoproteína de alta densidade e a redução das quantidades de cobre no plasma (Kohlmeier, 2003; Cruz & Soares 2011).

O zinco nos alimentos encontra-se essencialmente ligado às proteínas pelo que tem de ser inicialmente libertado antes de poder ser absorvido. Uma parte significativa do zinco entra no lúmen intestinal com as secreções oriundas do pâncreas, onde ocorre uma digestão pelas proteases, DNases e RNases libertando o zinco da matriz alimentar (Kohlmeier, 2003). Cruz & Soares (2011), citando Andrade *et al.* (2005), refere que 10 a 40% do zinco que é ingerido é absorvido. O zinco na forma livre e ionizada é absorvido por um mecanismo mediado por transportadores, sendo mais eficientemente absorvido quando presente em doses mais baixas do que quando presente em concentrações mais elevadas (Basu & Donaldson, 2003; Bouhallab & Bouglé in Gaucheron, 2003). A absorção do zinco é aumentada quando este se encontra complexado com a histidina, cisteína, ácido cítrico ou com nucleótidos (Basu & Donaldson, 2003; Kohlmeier, 2003). A absorção do zinco é também aumentada na presença da riboflavina, uma vez que esta vitamina ajuda a transportar este mineral para o interior dos enterócitos (Agte *et al.*, 1992 citado por Basu & Donaldson, 2003). O zinco passa para a corrente sanguínea por via de transporte ativo combinando-se com a albumina, aminoácidos e macroglobulinas (Andrade *et al.*, 2005 citado por Cruz & Soares 2011).

As perdas de zinco no organismo são efetuadas essencialmente a nível renal, pela pele e pelo intestino (FAO, 2001). A excreção pelas fezes está dependente da quantidade ingerida e do estado de zinco no organismo (Lee *et al.*, 1990 citado por Kohlmeier, 2003).

1.6.4. Magnésio

Os grãos inteiros, frutos secos e sementes são os alimentos que apresentam maiores quantidades de magnésio na sua composição. A água mineral também pode possuir uma quantidade relevante deste mineral (Sabatier *et al.*, 2002, citado por Kohlmeier, 2003). O magnésio é mesmo considerado, no caso dos grãos inteiros, o mineral com maior expressão (Oury *et al.*, 2006).

O magnésio é um cofator essencial num largo número de reações, nomeadamente reações que envolvem o trifosfato de adenosina (ATP) ou de guanosina (GTP), participa na despolarização dos nervos, é estabilizante dos ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA), sendo também um dos componentes minerais dos ossos (Kohlmeier, 2003). Delgado-Andrade (2008) refere como principais atributos do magnésio, a sua participação no metabolismo dos nutrientes, na contração dos músculos, nos sistemas nervoso e imunitário, e o facto de ser um elemento essencial para a fosforilação oxidativa. Para além do já referido é

de notar que cerca de 60% (Shils, 1999 citado por Roncero-Ramos, 2013; Perelson & Ellenbogen, 2002 citado por Delgado-Andrade, 2008) do magnésio se encontra nos ossos, sendo considerado o segundo elemento mais abundante no espaço intracelular, participa também no metabolismo energético (Roncero-Ramos 2013).

Como efeitos da deficiência em magnésio podem referir-se a desorientação, mudanças de personalidade, depressão, formigueiro, espasmos coronários, hipertensão ou vômitos. Por outro lado, o excesso de magnésio pode provocar náuseas, pressão sanguínea baixa e fraqueza muscular, entre outros efeitos (Kohlmeier, 2003).

Cerca de 30 a 60% do magnésio que é ingerido é absorvido (Kohlmeier, 2003) podendo ser absorvido nos três segmentos do intestino delgado assim como no cólon (Wolber *et al.*, 2013), parecendo no entanto a absorção ser superior no duodeno e no íleo (FAO, 2001). A absorção do magnésio pode ocorrer por difusão passiva, para ingestões altas deste elemento, ou mediante um transportador proteico quando ingestão é relativamente a baixa (Kohlmeier, 2003; FAO, 2001).

No sangue o magnésio circula na sua maioria na forma ionizada, cerca de 33% ligado a proteínas e 12% complexado com aniões (Kohlmeier, 2003). O rim é o órgão responsável pela regulação do equilíbrio deste mineral no organismo (Roncero-Ramos 2013), sendo cerca de 5% do magnésio filtrado é perdido através da urina (Kohlmeier, 2003). FAO (2001) citando Quarmer & Disks (1986) também salienta a importância do rim no que respeita à homeostase do magnésio, e refere que a reabsorção ativa deste elemento ocorre na ansa de Henle no túbulo proximal (condicionada pela concentração de sódio na urina e pelo equilíbrio ácido-base), Kohlmeier (2003) reforça acrescentando que somente uma pequena parte do magnésio é que é recuperado no túbulo distal.

1.6.5. Potássio

As leguminosas secas, cereais, fruta e produtos hortícolas contêm elevadas quantidades de potássio, sendo as carnes, peixes, crustáceos e moluscos também bons fornecedores deste mineral (Almeida & Afonso, 1997). Kohlmeier (2003) também considera que são as frutas e vegetais as maiores fontes de potássio referindo valores de potássio para o abacate de 6,3 mg/g, de 4mg/g para a banana e de 3,5 mg/g para a aveia.

O potássio é o principal agente catiónico osmótico no interior das células do organismo. Desempenha como principais funções o transporte de nutrientes e metabolitos, a ativação enzimática e tem um papel importante no que respeita à manutenção da polaridade celular, contração dos músculos e sinalização neuronal (Kohlmeier, 2003). Morris *et al.* (2006) citado por Braschi *et al.* (2009) salienta que de uma ingestão deficiente de potássio, de cerca de 70 a

120 mmol/dia, advêm algumas doenças como a osteoporose e doenças cardiovasculares. Whelton *et al.* (1997) citado pelo mesmo autor sugere que se for ingerida uma quantidade significativamente superior ao recomendado consegue reduzir-se a pressão arterial do sangue, sendo benéfico para a saúde.

Uma parte significativa de potássio é segregada pela saliva e pelos sucos gástrico e pancreático (Kohlmeier, 2003). Tanto este potássio como o potássio ingerido são absorvidos no intestino delgado, essencialmente por difusão passiva, seguindo um gradiente osmótico, e no cólon onde a absorção ocorre por processos ativos (Kohlmeier, 2003; Wolber *et al.*, 2013). A absorção do potássio é parcialmente regulada pelo sódio e por hormonas tais como a aldosterona (Wolber *et al.*, 2013). A maior parte do potássio ingerido é excretada na urina (Giebisch, 1998 citado por Braschi *et al.*, 2009). Outra forma de excreção ocorre pelas fezes, mas com menor expressão do que pela urina, tornando-se mais relevante em situação de diarreia. São de referir também algumas perdas de potássio pelo suor e outras secreções corporais (Kohlmeier, 2003).

1.7. Bioacessibilidade e Biodisponibilidade

A absorção intestinal do total de nutrientes presentes nos alimentos ingeridos pode não ser completa, ou seja, uma percentagem dos micronutrientes e fitoquímicos ingeridos pode não chegar a ficar disponível para ser utilizada pelos organismos. É neste contexto que surgem então os conceitos de bioacessibilidade e biodisponibilidade, que, de uma forma geral, se referem à fração dos constituintes dos alimentos ingeridos que pode de facto ser utilizada pelos organismos.

A bioacessibilidade representa a fração de um dado nutriente ou fitoquímico que é libertada da matriz do alimento no trato gastrointestinal, tornando-se solúvel e disponível para ser absorvida. Este conceito envolve todas as transformações que ocorrem na digestão dos alimentos até se tornarem assimiláveis pelo organismo Holst & Williamson (2008).

Existem várias definições para o conceito de biodisponibilidade, dependente da área de investigação a que se aplica, algumas diferenças são também verificadas entre autores. Na pesquisa bibliográfica efetuada para a realização do presente estudo, foram várias as definições encontradas, desta forma, e sendo que a biodisponibilidade tem vindo a ser definida de diferentes formas, referem-se seguidamente algumas dessas definições.

Fairweather-Tait (1993) citado por Fernández-Garcia *et al.*, (2009) define biodisponibilidade como a fração correspondente do nutriente ou componente bioativo ingerido que fica disponível para ser usado em funções fisiológicas ou para ser armazenado. Cita também Benito & Miller (1998) que dita que a biodisponibilidade se trata da proporção dum dado nutriente dum dado

alimento da dieta que o organismo consegue realmente usar. Van Campen & Glahn (1999) usa no seu estudo a definição de que biodisponibilidade se refere à quantidade do nutriente que se encontra disponível para ser absorvido numa forma fisiologicamente utilizável. Segundo Welch & House (1984) citado por House (1999) a biodisponibilidade refere-se à proporção da quantidade total de micronutrientes presentes num alimento que é potencialmente absorvido na forma metabolicamente ativa. Já Fernández-García *et al.* (2009) defende que a biodisponibilidade também inclui a bioatividade, ou seja, que a biodisponibilidade engloba a disponibilidade para ser absorvido, a absorção, o metabolismo, a distribuição pelos tecidos e a bioatividade, relacionando a bioatividade com todos os processos (interação com biomoléculas, metabolismo, biotransformação), e a forma como o composto bioativo é transportado até atingir o tecido alvo. Segundo este autor a bioatividade não implica a absorção, dando como exemplo o caso dos polissacáridos e oligossacáridos não digeríveis que não sendo absorvidos conferem benefícios à saúde.

Analisando todas estas definições de biodisponibilidade pode dizer-se que os termos biodisponibilidade e bioacessibilidade têm sido usados de forma indistinta Fernández-García *et al.* (2009). No presente estudo o termo bioacessibilidade será utilizado para designar a fração dos nutrientes que é libertada da matriz do alimento no trato gastrointestinal, tornando-se solúvel e disponível para ser absorvida e por biodisponibilidade a fração que é de facto absorvida. Neste contexto a bioacessibilidade é necessária para a biodisponibilidade, dado que, o pré-requisito da biodisponibilidade de um elemento é a sua bioacessibilidade no intestino. A bioacessibilidade está dependente de fatores como a matriz do alimento, o seu processamento ou da forma como decorre a digestão gastrointestinal. Desta forma uma bioacessibilidade insatisfatória pode comprometer seriamente a biodisponibilidade de um dado nutriente.

Vários fatores dietéticos podem afetar a bioacessibilidade/biodisponibilidade de nutrientes, incluindo, a forma química do nutriente no alimento, a natureza da matriz dos alimentos, as interações que ocorrem entre os nutrientes desse alimento e de outros que com ele são ingeridos e o pré-tratamento do alimento durante o processamento e/ou preparação (Gibson *et al.*, 2006). Gibson *et al.*, 2006 refere como principais inibidores da biodisponibilidade de minerais em alimentos de origem vegetal, os fitatos, a proteína dos grãos de soja, os polifenóis, o ácido oxálico e a fibra dietética. Como facilitadores considera os ácidos orgânicos, o ácido ascórbico, a proteína e a gordura. Estes fatores serão tidos em consideração no ponto (1.8.4) no que respeita à sua influência nos minerais em estudo.

1.8. Metodologias para determinação da bioacessibilidade/biodisponibilidade

Existem diferentes metodologias que podem ser utilizadas para avaliar a bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade dos nutrientes. Essas técnicas englobam ensaios mais diferenciados, como é o caso dos ensaios *in vivo*, e ensaios mais simples e fáceis de efetuar como é o caso das metodologias *in vitro*.

1.8.1 Métodos *in vivo*

Estes métodos, como o próprio nome indica, requerem o recurso a animais ou são efetuados em humanos. Quando comparados com os métodos *in vitro*, são mais precisos, recaindo a sua desvantagem no seu alto custo e no tempo que requerem (Hur *et al.*, 2011). De acordo com o autor Fernandez-Garcia *et al.* (2009) as vantagens destes métodos passam por se efetuarem realmente situações *in vivo*, serem utilizados indivíduos específicos para o que se pretende estudar e permitir amostragem suficiente no caso dos estudos farmacêuticos. Como principais desvantagens faz referência ao seu custo, à dúvida que resulta da aplicação de modelos animais quando contrapostos para a situação humana, questões dos fatores envolvidos na biodisponibilidade e a falta de padrões de referência para que possam ser efetuadas comparações entre laboratórios. A juntar a todas estas desvantagens surgem também as não menos importantes questões de ordem ética. Domínguez-González *et al.* (2010) acrescenta que estes métodos são os que melhor traduzem a biodisponibilidade. Baseado no autor Van Campen & Glahn (1999) os métodos *in vivo* dividem-se nos seguintes grupos:

✓ Métodos de Balanço

Os métodos de balanço consideram-se os primeiros métodos utilizados no estudo da biodisponibilidade e baseiam-se no resultado entre o que é ingerido e o que é excretado (Van Campen & Glahn, 1999; Fernandez-Garcia *et al.*, 2009), considerando que a fração resultante deste balanço corresponde à biodisponibilidade (Cozzolino, 1997). No entanto, estes métodos, não contemplam nem contabilizam a fração endógena do nutriente (Cozzolino, 1997). Estão incluídos nestes métodos o balanço químico, o balanço de radioisótopos e o balanço do isótopo estável.

✓ Concentração nos tecidos ou indicadores indiretos

Esta técnica é uma estratégia que permite determinar a quantidade absorvida de nutrientes ou compostos bioativos bem como os seus metabolitos (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009). Esta metodologia assenta na premissa de que a concentração no tecido deriva do aumento da concentração de um nutriente ou composto bioativo no plasma (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009), ou seja monitoriza as mudanças nas concentrações no plasma após a ingestão de doses orais

dos elementos em quantidades consideradas farmacológicas e não fisiológicas (Van Campen & Glahn, 1999).

✓ Diluição isotópica / análise compartimental

O princípio desta metodologia consiste na injeção de um radionuclídeo no plasma que se vai distribuir homogeneamente nos fluidos corporais, considerando-se a sua presença nas fezes como indicativa da fração endógena. Nas fezes além do fração endógena encontra-se igualmente a fração exógena que corresponde à fração não absorvida proveniente dos alimentos. A quantidade do elemento que é absorvida pode então ser calculada a partir da quantidade total que é ingerida, da quantidade total que existe nas fezes descontando a quantidade que corresponde à fração endógena, que se deteta medindo a atividade do elemento nas fezes (Brigide *et al.*, 2011). Estes estudos são considerados os mais avançados nesta matéria, sendo cada vez mais utilizados para a determinação da biodisponibilidade de minerais. Contudo, o seu custo, tanto a nível dos isótopos enriquecidos como dos equipamentos necessários representam uma importante desvantagem (Cozzolino, 1997).

✓ Contagem de corpo inteiro

É um método passível de ser utilizado quer em humanos quer em animais, sendo possível a sua utilização com o recurso a pequenas quantidades de radioisótopos, sujeitando os indivíduos a uma baixa exposição à radiação (Van Campen & Glahn, 1999). Neste método é feita uma contagem inicial imediatamente após administração do material marcado e antes deste poder ser excretado, seguem-se várias contagens efetuadas em intervalos de tempo (10 a 14 dias), os resultados são expressos em percentagem mediante a seguinte forma (Benito & Miller, 1998):

$$\text{Retenção} = (\text{Contagem tempo}_t / \text{Contagem tempo}_0) \times 100$$

São de referir como vantagens deste método o facto de não serem necessárias recolhas de amostras fecais e urinárias, contudo, apresenta a desvantagem de eventuais variações de contagens ao longo do tempo (Van Campen & Glahn, 1999).

✓ Marcação intrínseca e extrínseca

Estes estudos de retenção consistem na marcação com marcadores intrínsecos ou extrínsecos de refeições ou componentes incluídos na refeição (House, 1999). O método de marcação extrínseca baseia-se essencialmente na adição de um isótopo a um alimento ou refeição, recorre-se normalmente à forma de um sal inorgânico, assumindo que o isótopo adicionado comporta-se da mesma forma que os elementos naturais nativos e são absorvidos da mesma

maneira (House, 1999). Este método é mais barato e mais simples do que o recurso à marcação intrínseca, contudo pode não espelhar a absorção (Ammerman in Ammerman *et al.*, 1995).

A marcação intrínseca consiste na adição de um isótopo no interior de uma porção comestível do alimento durante o seu crescimento, ou seja este é biologicamente incorporado nos tecidos vegetais ou animais, ficando associado aos constituintes naturais do alimento (House, 1999).

1.8.2. Métodos *in vitro*

Os métodos *in vitro* realizam a simulação das digestões gástrica e intestinal de alimentos e permitem aferir a fração dos nutrientes que fica disponível para ser absorvida (fração bioacessível). Quando utilizados para a aferição da biodisponibilidade de minerais, estes métodos são complementados com técnicas de diálise ou de com culturas de enterócitos que permitam estudar a passagem através de membranas/absorção dos nutrientes.

Apesar de ser reconhecido que têm limitações, os métodos *in vitro* de determinação da bioacessibilidade, são métodos que se apresentam como uma boa alternativa aos métodos *in vivo* pela sua simplicidade, rapidez e baixo custo. De um modo geral, estes métodos expressam a fração solúvel dos elementos passível de ser absorvida, em condições controladas de pH, adição de enzimas, temperatura, agitação e tempo de contato. As enzimas e moléculas biológicas normalmente utilizadas nestes métodos incluem a pepsina, a pancreatina, a tripsina, peptidase, amilase, sais biliares ou a mucina, podendo estes componentes ser de origem humana ou ser extraídos de animais ou plantas (Hur *et al.*, 2011).

Estes métodos requerem uma centrifugação após a digestão, através da qual ocorre a separação do sobrenadante e do precipitado, o primeiro corresponde à fração solúvel e bioacessível. O doseamento dos vários nutrientes nesta fração terá de ser posteriormente quantificado por absorção atômica, espectrometria de massa, cromatografia líquida de alta precisão entre outras técnicas consoante a natureza dos compostos ou elementos que se pretendem estudar. Os resultados são normalmente expressos como a percentagem dos compostos/elementos solúveis face à quantidade total presente na amostra inicial (Etcheverry *et al.*, 2012). Na sua maioria os modelos utilizados na simulação da digestão são estáticos, sendo as amostras expostas à simulação da sequência boca, estômago e intestino delgado. Os sistemas dinâmicos são pouco utilizados, sendo modelos que imitam o trânsito gradual de misturas no trato digestivo humano através de condições fisiológicas simuladas (Intawongse & Dean, 2006).

Dos vários métodos que têm vindo a ser utilizados na simulação *in vitro* do processo digestivo, Hur *et al.* (2011) referem a existência de diferenças ao nível do número e tipos de passos

incluídos nessa mesma simulação da digestão (boca, estômago, intestino delgado, intestino grosso), da composição dos fluidos digestivos e das tensões mecânicas e fluxos de fluidos aplicadas em cada passo da sequência. Contudo ainda nenhum desses procedimentos experimentais para estudar a bioacessibilidade foi totalmente aceite (Hur *et al.*, 2011). Acresce ainda que a falta de padrões de referência para que possam ser efetuadas comparações entre laboratórios constitui também uma limitação destes ensaios.

Para tentar ir mais além, e tentar estudar também o passo de absorção, os ensaios de bioacessibilidade podem ser complementados com outras técnicas, que incluem a diálise e a cultura de células, de modo a tentar avaliar a taxa de captação ou absorção e a estudar a competição dos nutrientes ou componentes do alimento no local de absorção (Etcheverry *et al.*, 2012). Os métodos de diálise incluem uma membrana de diálise durante o processo de digestão, de modo a permitir que seja simulada uma difusão passiva através da mucosa intestinal, ou seja, este passo permite efetuar a diferenciação entre os compostos solúveis de alto peso molecular e os de baixo peso molecular (Martos, 2004). Apesar de poderem dar alguma informação sobre a difusão através de membranas estes métodos têm a limitação de não poder verificar a existência de outro tipo de transporte através de membranas, nomeadamente o transporte mediado por proteínas.

O recurso à utilização de culturas de células representa uma forma mais robusta para estudar a biodisponibilidade. As células mais utilizadas para este efeito são a linha Caco-2 que advêm de um adenocarcinoma humano. Esta linha celular diferencia-se em enterócitos polarizados com microvilosidades, actuando similarmente às células epiteliais intestinais, expressando diversos transportadores (Van Campen & Glahn, 1999). Utilizando esta técnica é possível o estudo do nutriente ou componente do alimento no seu local de absorção, sendo possível determinar a fração dos componentes solúveis que consegue de facto ter acesso ao meio intracelular.

1.8.3. Biodisponibilidade dos minerais

A biodisponibilidade dos minerais apresenta-se essencial para que possam ser estabelecidas as recomendações de ingestão diárias, perante as necessidades do indivíduo (Cozzolino, 1997). Isto porque, somente o conhecimento da biodisponibilidade dos nutrientes é que traduz verdadeiramente o valor nutritivo dos alimentos, uma vez que são poucos os nutrientes que se encontram totalmente disponíveis para serem absorvidos pelo organismo após a sua ingestão (Santos *et al.*, 2004). A absorção dos minerais é passível de acontecer de duas formas, de forma passiva, através do transporte passivo que por difusão os minerais conseguem transpor as junções entre os enterócitos e entrar na corrente sanguínea, e por transporte ativo requerendo gasto de energia (ATP) para ocorrer, neste caso, os minerais são transportados para o interior dos enterócitos por transportadores existentes na membrana apical sendo libertado pela membrana basal atingido os vasos sanguíneos (figura 1.3), (Wolber *et al.*, 2013).

De um modo geral, a concentração dos micronutrientes é determinante neste processo, sendo que, a absorção é ativa nas concentrações dietéticas normais e pode ser passiva quando se trata de altos teores ingeridos (Sandstrom, 2001).

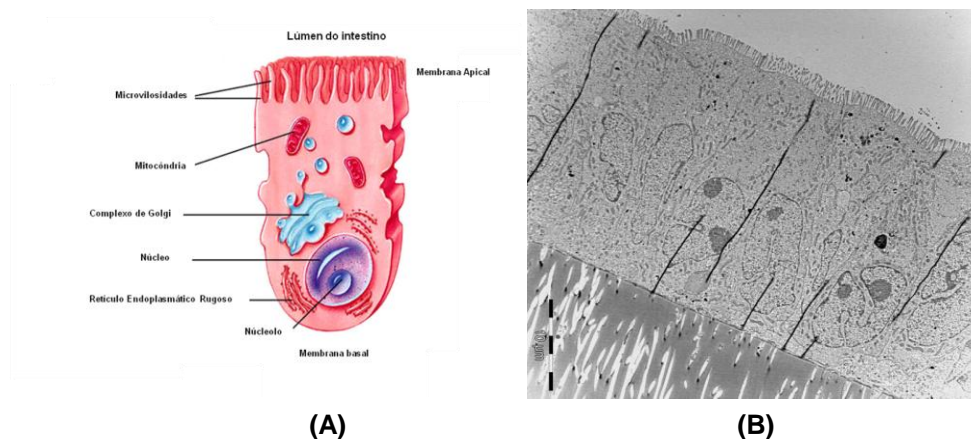


Figura 1.3: (A) Esquema geral simplificado de um enterócito (disponível em <http://quizlet.com/12743043/bio-digestive-system-flash-cards/>) e (B) Imagem obtida por microscopia electrónica de transmissão (TEM) de enterócitos (disponível em <http://www.umb.no/ikbm/artikkel/molecular-cell-biology-2>).

A biodisponibilidade dos minerais apresenta uma enorme variabilidade, podendo ir de 1% para algumas formas de ferro até mais de 90% para o potássio (Miller, 2008). A digestibilidade, a capacidade de complexar com outros elementos presentes nos alimentos, a natureza química dos compostos assim formados e também da competição no local da absorção são alguns dos fatores que podem influenciar a biodisponibilidade dos minerais (Santos *et al.*, 2004). Assim, a biodisponibilidade dos minerais não pode ser observado de forma isolada, mas sim tendo em conta todos fatores biológicos, fisiológicos e nutricionais que podem afetar a absorção, transporte e armazenamento, determinando a sua deficiência ou toxicidade (Lobo & Tramonte, 2004).

A avaliação da biodisponibilidade é uma questão complexa porque, para além de depender do conteúdo e da forma em que estes se encontram nos alimentos e das necessidades do organismo, pode ainda sofrer interferências da restante composição da refeição. Por exemplo, a existência de fatores antinutricionais no próprio alimento ou em alimentos que com ele sejam ingeridos, como é o caso de compostos que tenham efeito quelante passíveis de formar quelatos insolúveis com os minerais, pode fazer diminuir a biodisponibilidade destes elementos. Também se pode verificar a situação oposta existindo alguns componentes dos alimentos que conseguem favorecer a biodisponibilidade dos minerais (revisto em Wolber *et al.*, 2013). O processamento dos alimentos também afeta não só o conteúdo mineral dos alimentos mas também a sua biodisponibilidade uma vez que pode remover fatores antinutricionais ou acrescentar compostos promotores da sua solubilização e/ou absorção. O

pH do lúmen intestinal do organismo, os fatores da dieta do indivíduo ou o tempo de absorção também podem influenciar a biodisponibilidade (Liang *et al.*, 2008). Com efeito, a biodisponibilidade dos minerais está dependente da sua solubilidade no lúmen intestinal que, por sua vez, está diretamente dependente do pH do lúmen intestinal (Schumann & Elsenhans, 2002).

No caso concreto dos minerais são conhecidas algumas interações entre eles que podem ter influência na sua biodisponibilidade. Segundo Sandstrom (2001) os minerais com semelhanças químicas possuem a capacidade de competir nos mecanismos de absorção como é o caso do transporte de proteínas. De referir que o ferro e o zinco interagem muito entre si, ou seja, um interfere diretamente na disponibilidade do outro, sendo que o aumento do ferro afeta a biodisponibilidade do zinco e vice-versa. Já o cálcio quando se apresenta em grandes quantidades provoca uma diminuição da biodisponibilidade do ferro. O cálcio interage igualmente com o zinco, diminuindo a sua absorção, sobretudo quando em presença de fitatos, dado que se forma um complexo cálcio-fitato-zinco, que afeta negativamente o balanço do zinco. Pelo contrário a interação entre o cálcio e o magnésio não se mostra significativa para o homem (revisto em Cozzolino, 1997).

1.8.4. Condicionantes da biodisponibilidade dos minerais nos cereais e derivados

A biodisponibilidade dos minerais nos cereais e, em particular, nos grãos de trigo, é condicionada por vários fatores, sendo que um deles é o conteúdo em fibras. Com efeito, as fibras presentes nos grãos de cereais são apontadas como elementos que podem reduzir a biodisponibilidade dos minerais. Bosscher *et al.* (2001) observou que a adição de fibras dietéticas como agentes espessantes do leite em doses de 0,5g/100 mL diminuía em 25 a 50% a biodisponibilidade dos elementos ferro, zinco e cálcio. O mecanismo pelo qual as fibras insolúveis reduzem a biodisponibilidade dos metais pode passar pela sua ligação aos minerais, que leva à remoção destes da fração solúvel e potencialmente absorvível (Almeida & Afonso, 1997).

O ácido fítico e o ácido oxálico são antinutrientes a ter em consideração. O ácido fítico encontra-se presente na camada de aleurona e forma complexos insolúveis com os catiões (magnésio, cálcio, zinco e ferro), tanto no alimento propriamente dito, como durante a sua digestão, impedindo a sua absorção no intestino (Oury *et al.*, 2006). O fitato é um agente quelante de iões e devido ao facto da baixa atividade da fitase nos humanos não é facilmente digerido nem absorvido no intestino (Coudray *et al.*, 2001). O fitato não pode ser encarado somente de um ponto de vista negativo, assim desde 1980 que têm sido clarificadas as suas importantes funções fisiológicas, tais como, a função como antioxidante, hipocolesterolémico ou hipolipidémico (revisto em Grases *et al.*, 2001). Febles *et al.* (2002) citado por Akhter *et al.*

(2012) também assinalam as suas características como antioxidante, anticarcinogénico e agente preventivo de doenças coronárias.

Frontela *et al.* (2011) reforça que a biodisponibilidade dos minerais nos grãos é baixa devido à quantidade alta de ácido fítico presente, entre 1 e 4%. No entanto, os grãos de cereais possuem a fitase endógena (di-hidrogenofosfato fosfohidrolase), que é uma enzima capaz de quebrar as ligações covalentes dos grupos fosfatos com o anel inositol e que atua hidrolisando o ácido fítico em ésteres de fosfato de mio-inositol, com menor capacidade para se ligarem aos minerais eliminando ou atenuando o efeito antinutricional do ácido fítico (Frontela *et al.*, 2011).

O facto do ácido fítico poder diminuir a biodisponibilidade dos minerais faz com que a sua remoção na moagem dos subprodutos seja nutricionalmente benéfica. Eklund-Jonsson *et al.* (2006) efetuaram um estudo com objetivo de reduzir o fitato em grãos através de condições especiais para que fosse ativada a fitase endogéna dos cereais e/ou pela fitase produzida por *Rhizopus oligosporus*, melhorando desta forma a absorção de minerais. Tendo também como intuito a preservação da composição dos grãos no que respeita à sua composição nutricional, dado o consumo de cereais estar associado à diminuição do risco de algumas patologias.

Especificamente na panificação, a redução do fitato depende da atividade da fitase, do grau de extração de farinha, do pH da própria massa e da presença de sais de cálcio (Frontela *et al.*, 2011). O autor Oury *et al.* (2006) afirma que o valor nutricional do pão conseguiria ser melhorado através da utilização de novas cultivares que possuíssem concentrações mais elevadas de minerais e mais elevada atividade da enzima fitase. A biodisponibilidade dos minerais no pão também pode ser aumentada através da adoção de processos de panificação que estimulem a atividade da fitase da farinha (Oury *et al.*, 2006).

A fermentação pode ser um dos processamentos capazes de reduzir os fatores antinutricionais como é o caso do fitato. A fermentação “tempe” é tradicional na indonésia, e consiste basicamente na incubação de grãos de soja inteiros com uma cultura de arranque *Rhizopus sp.* Durante a fermentação o micélio do fundo liga-se aos grãos de soja formando um bolo. Uma das razões desta fermentação é o aumento da digestibilidade das proteínas, do amido e a diminuição ou eliminação de fatores antinutricionais, como é o caso do fitato, através da formação de fitase durante o processo fermentativo (Eklund-Jonsson *et al.*, 2006).

Outros dos constituintes dos alimentos de origem vegetal que afetam a biodisponibilidade dos minerais são os polifenóis, em particular os taninos condensados (polímeros de flavonóides) que representam a maioria dos polifenóis presente nos cereais (Silva & Silva, 1999). Os polifenóis têm sido considerados “antinutrientes”, devido à sua capacidade de reduzir a absorção de diversos minerais, bem como a digestibilidade das proteínas provocando um aumento da excreção fecal de azoto (Ferguson, 2001). O ácido ascórbico (vitamina C) é capaz

de neutralizar os efeitos inibidores dos taninos e fitatos promovendo a absorção do ferro (Sandstrom, 2001).

Os alimentos podem também conter contaminantes que quando se apresentam em concentrações significativas podem influenciar a biodisponibilidade dos minerais. São exemplos os solventes orgânicos, pesticidas, micotoxinas e metais contaminantes, entre outros. A influência destes contaminantes, pode resultar do facto de poderem provocar danos tóxicos nos mecanismos de transporte, conseguirem ligar-se aos metais, afetar a regulação homeostática e excreção de metais essenciais (Schumann & Elsenhans, 2002).

É de referir neste âmbito, que, embora existam muitos fatores que interferem de forma prejudicial com a biodisponibilidade dos minerais, existem também alguns que a facilitam e/ou beneficiam. São exemplo disso, para além da já referida fermentação, alguns tratamentos e processamentos que os alimentos sofrem antes de serem ingeridos (Leal *et al.*, 2010). Por exemplo, nos alimentos de origem vegetal, o tratamento térmico e a homogeneização têm um efeito positivo na biodisponibilidade dos minerais e componentes fitoquímicos (Eklund-Jonsson *et al.*, 2006). As melanoidinas, produtos finais das reacções de Maillard de elevado peso molecular, podem complexar com elementos como o magnésio, cálcio, cobre, ferro ou zinco, afetando assim a sua absorção (Delgado-Andrade *et al.*, 2008; Roncero-Ramos *et al.*, 2013). Não obstante, Delgado-Andrade *et al.* (2008) referem que, os compostos de baixo peso molecular solúveis em água, melhoram a absorção de metais ao formarem quelatos que são absorvidos no trato intestinal. Apesar das desvantagens que os produtos das reacções de Maillard podem acarretar na biodisponibilidade dos minerais, eles têm também funções benéficas resultante da sua capacidade antioxidante natural (Roncero-Ramos *et al.*, 2013).

A proteína, nomeadamente a proteína animal aumenta a absorção do ferro, zinco e cobre devido a estabelecer ligações com estes elementos que facilitam a sua solubilização (Gibson *et al.* 2006). Este autor fazendo referência a Lonnerdal (2000) refere que a proteína também é responsável pelo aumento da excreção de cálcio através da urina.

1.8.5. Biodisponibilidade do Ferro

A biodisponibilidade do ferro depende da forma em este se apresenta, sendo que na forma de sulfato e fumarato ferroso apresenta uma biodisponibilidade elevada, o mesmo não se verifica quando se apresenta na forma de ferro elementar. Contudo, a biodisponibilidade tem sempre em consideração o tipo de alimento, como é processado e o próprio indivíduo, estes são portanto, fatores muito importantes a ter em conta neste tema (Germani *et al.*, 2001).

Alguns elementos existentes nos alimentos favorecem ou inibem a correta absorção de ferro pelo organismo. Segundo Benito & Miller (1998) dentro dos fatores dietéticos considera como

grandes potenciadores da absorção de ferro não heme, o ácido ascórbico e a carne, e como principais inibidores da sua absorção os polifenóis, o ácido fítico, o cálcio, o fosfato de cálcio, os produtos de soja entre outros. O autor defende ainda que a interação destes fatores no lúmen intestinal determinam a absorção do ferro não heme.

Perante uma deficiência em ferro, é aconselhável o recurso à conjugação de alimentos com fatores promotores da sua absorção. Uma das interações que favorecem a absorção de ferro é, conforme anteriormente referido a vitamina C ou ácido ascórbico (Sandstrom, 2001; Germano & Canniatti-Brazaca, 2002). A vitamina C reduz o ferro não heme que se encontra na forma férrica a ferrosa, mantendo-o solúvel no pH intestinal, ajudando desta forma a sua absorção. (Germano & Canniatti-Brazaca, 2002). Segundo Sandstrom (2001) o ácido ascórbico consegue neutralizar os efeitos inibidores dos fitatos e dos taninos. O autor Van Dyck *et al.* (1996) no seu estudo sobre a influência de diferentes componentes dos alimentos na disponibilidade do ferro, zinco e cálcio numa refeição composta, verificou que o ácido ascórbico aumentou a disponibilidade de ferro em cerca de 5%, justificando este aumento devido à dupla ação deste elemento que, por um lado, possui a capacidade de reduzir o ferro férrico e, por outro reduz a precipitação do ferro através da quelação. Germano & Canniatti-Brazaca (2002) citando Caballero (1988) indica que as proteínas também promovem a absorção de ferro não heme devido à ação dos aminoácidos, principalmente da cisteína. Também os ácidos orgânicos, como, por exemplo, os ácidos cítrico, acético e butírico, são indicados como possíveis elementos que incrementam a absorção de ferro (Gibson *et al.*, 2006).

Germano & Canniatti-Brazaca (2002) referem que quando o zinco e o ferro se encontram juntos em suplementos alimentares, numa proporção de Zn:Fe de 2:1, se verifica que o zinco interfere inibindo a absorção de ferro. Já Pérès *et al.* (2001), no seu estudo sobre a inibição da absorção do zinco pelo ferro depende dos seus raios, obteve como resultados que para a proporção de Fe:Zn de 2:1 ocorria a inibição da absorção de zinco atingindo o ponto máximo na proporção 5:1.

O cálcio também interfere com a absorção do ferro. Lobo & Tramonte (2004) e Fairweather-Tait (1995) fazem referência a alguns estudos que demonstram que a suplementação em cálcio reduz a absorção de ferro, nomeadamente o estudo de Dawson-Hughes *et al.* (1986), o estudo de Cook *et al.* (1991) e de Hallberg *et al.* (1991). No entanto Fairweather-Tait (1995) enumera estudo em humanos de Apte & Venkatachalam (1964) que mostram o oposto, ou seja, que a interação entre o cálcio e o ferro é benéfica sendo que o cálcio favorece a absorção de ferro. Também Germano & Canniatti-Brazaca (2002) citando Wauben & Atkinson (1999) referem que no estudo destes autores, dietas com quantidades elevadas de cálcio não comprometeram o *status* de ferro. A justificação para estes resultados discrepantes pode passar pelo facto das interações entre estes elementos ocorrem quando estes são

administrados como solutos, enquanto que através dos alimentos esta interação não é observada (Pérès *et al.*, 2001).

1.8.6. Biodisponibilidade do Zinco

O zinco é um elemento que não possui propriedades redox, o que permite a sua incorporação em sistemas biológicos dos mamíferos, sem o risco de ocorrer oxidação (Hambidge, 2000). Encontra-se nos sistemas biológicos na forma de Zn^{2+} e muito dificilmente altera esta valência, trata-se de um ácido de Lewis e por isso liga-se a dois ligantes doadores de eletrões, geralmente liga-se a grupos sulfidrílicos (-SH) e grupos amina, encontrando-se normalmente ligado a proteínas (Cousins, 1996 citado por Miller, 2008).

De acordo com Sandstrom (1995) a fração de zinco absorvida diminui com o aumento da quantidade deste elemento que se encontra presente. Os alimentos de origem vegetal possuem baixos valores em zinco. Uma das limitações do zinco nos produtos vegetais, é o facto destes possuírem fitatos (principalmente os grãos inteiros), que interferem fortemente na absorção deste elemento (Sandstrom, 1995; Kohlmeier, 2003). A absorção do zinco não é somente prejudicada pelo fitato mas também pelo oxalato, pelos taninos e pelos polifenóis (Kohlmeier, 2003) e pela fibra (Cruz & Soares, 2011).

Como facilitadores da sua absorção refere-se a presença de aminoácidos (cisteína e histidina), os fosfatos e os ácidos orgânicos que formam ligandos solúveis no trato gastrointestinal (Gibson *et al.*, 2006) e a proteína (Cruz & Soares, 2011). Sandstrom (1995) salienta que é conseguida uma biodisponibilidade alta (30 a 40%) em dietas baseadas em proteína animal, numa mistura entre proteína animal e vegetal com cereais não refinados, sendo que as dietas com pouca proteína animal e ricas em fitatos apresentam uma biodisponibilidade de zinco em valores muito baixos cerca de 15%. Larsen & Sandstrom (1992) apontam através dos resultados que obtiveram que existiu uma correlação entre a absorção de zinco e as concentrações de cálcio e zinco fornecidas na dieta. Assim em animais suplementados com zinco a adição de cálcio não foi relevante, contudo os que obtiveram o zinco exclusivamente da dieta, ou seja sem suplementação com zinco, a absorção deste elemento decresceu perante a adição de cálcio na dieta. Sandstrom (2001) no que respeita à interação do cálcio com o zinco cita diversos trabalhos que referem que o cálcio não tem influência direta na absorção de zinco, contudo o cálcio na presença do fitato afeta a absorção de zinco, podendo este facto ser justificado pela co-precipitação do fitato com o zinco. O mesmo autor, defende ainda que enquanto suplemento o cálcio induz uma interação negativa com o zinco.

1.8.7. Biodisponibilidade de Cálcio

Normalmente, quanto maior for a quantidade de cálcio ingerida maior é a quantidade de cálcio absorvida pelo organismo, no entanto, quando dissolvido, pode complexar ou ligar-se a gorduras ou fitatos e a sua absorção ser prejudicada (Bass & Chan, 2006). A absorção do cálcio é fortemente condicionada pela vitamina D, que favorece a sua absorção e retenção, enquanto que o fosfato, sódio e a ingestão de proteína animal a diminui a sua absorção ou retenção (Kohlmeier, 2003). O sódio influencia no sentido de que quanto maior for a ingestão deste elemento maior será a excreção de cálcio por via renal (Pereira *et al.*, 2009).

Os fitatos conseguem formar complexos insolúveis com o cálcio, reduzindo assim a sua biodisponibilidade. Perante o cálcio, os fitatos, são mais condicionantes na solubilização do que os oxalatos, o extrato de fibra do trigo ou a caseína (Etcheverry *et al.*, 2012). Os fosfatos e o cálcio formam complexos com fraca solubilidade, e por conseguinte a fração absorvida de cálcio diminui. O mesmo acontece em relação ao oxalato que também estabelece ligações muito fortes com o cálcio, inibindo fortemente a sua absorção (Kohlmeier, 2003).

Etcheverry *et al.* (2012), cita como justificativo, o estudo de Liang *et al.* (2010), que efetuou um ensaio de solubilidade *in vitro* para comparar alimentos à base de arroz, verificando que altos níveis de fitatos (14,9 a 19,4 mg/ácido fítico/g de arroz) no arroz integral, induziam valores baixos de solubilidade do cálcio (12%). Segundo Frontela *et al.* (2009), citado pelo mesmo autor, considera que o efeito inibitório dos fitatos em relação ao cálcio depende dos rácios em que ambos se encontram.

Etcheverry *et al.* 2012 sugere que as fibras solúveis também possam influenciar positivamente ou negativamente a absorção de cálcio, enunciando estudos em que algumas fibras, como a goma de alfarroba, reduziu o cálcio dialisado, devido à sua capacidade de formar complexos, e em que a adição de inulina aumentou em 30% a disponibilidade do cálcio. As fibras, como a celulose e a hemicelulose, estabelecem ligações com este metal no intestino afetando negativamente a sua biodisponibilidade (Almeida & Afonso, 1997). Há fibras que sofrem fermentação no cólon, aumentando a acidez e, por conseguinte, a solubilidade do cálcio, ocorrendo a degradação do ácido fítico sendo a absorção promovida nesta zona do intestino. Gibson *et al.* (2006) no que respeita à fibra dietética em relação ao cálcio, indica que as fibras são fermentadas pela microflora existente no intestino grosso e os ácidos gordos de cadeia curta formados aumentam a solubilidade do cálcio. Trinidad *et al.* (1996) citado por Behall *et al.* (2002) reforça enunciando que uma infusão retal de ácidos gordos de cadeia curta em humanos simulando a fermentação mostrou um aumento da absorção de cálcio no cólon distal.

1.8.8. Biodisponibilidade do Magnésio

A biodisponibilidade do magnésio detém uma enorme importância devido a tratar-se de um elemento que apresenta importantes implicações na saúde humana e desempenha importantes funções no organismo (Delgado-Andrade *et al.*, 2008). Cozzolino (1997) refere que a interação entre do cálcio e o magnésio não é significativa, mas reforça que uma dieta pobre em magnésio com o crescente consumo de alimentos suplementados com cálcio pode tornar-se de maior relevância. No entanto, Larsen & Sandstrom (1992) verificaram que a absorção de magnésio aumenta com a adição de cálcio dietético e também obtiveram uma melhor absorção de magnésio perante um nível elevado de zinco na dieta.

O processamento térmico dos alimentos é também responsável pelas alterações no conteúdo deste mineral. Assim, os produtos das reações de Maillard de maior peso molecular e insolúveis em água podem diminuir a absorção do magnésio (Delgado-Andrade *et al.*, 2008). A biodisponibilidade do magnésio é também afetada por alguns constituintes dos alimentos, como, por exemplo, a fibra, a proteína, o fósforo (Etcheverry *et al.*, 2012).

1.8.9. Biodisponibilidade do Potássio

São escassos os trabalhos focados sobre a biodisponibilidade do potássio. Braschi *et al.* (2009) citando James *et al.* (1987) considera que o grande motivo das perdas de potássio nos alimentos se deve essencialmente ao processamento a que são sujeitos. Kohlmeier (2003) é outro autor que refere esta justificação para as perdas de potássio, justificando que ocorre devido à elevada solubilidade que os sais de potássio apresentam em água. Exemplifica esta perda com o espinafre que quando cozido e escorrido apresenta 17% menos de potássio em relação ao espinafre cru.

1.9. Enquadramento e Objetivos

Conforme já referido, os cereais e os produtos cerealíferos são vistos, do ponto de vista nutricional, como as principais fontes de elementos essenciais na alimentação humana, estimando-se que, nos países ocidentais, contribuam em cerca de 20 a 30% para o total de minerais e oligoelementos consumidos (Carcea *et al.*, 2007 citado por Cubadda *et al.*, 2009). Dos vários produtos alimentares derivados de cereais o pão é sem dúvida um dos mais importantes, sendo consumido em todo o mundo, e sendo considerado, em muito países, como o alimento mais básico da dieta (Mondal & Datta 2008; Brites *et al.*, 2011), estimando-se que cerca de 50% da energia diária resulte da ingestão de glúcidos provenientes do seu consumo (Brites *et al.*, 2011).

A mecanização, a produção de pão em larga escala, a necessidade de prolongar o tempo de prateleira dos produtos de padaria e o maior grau de exigência dos consumidores, que

procuram produtos cada vez mais sofisticados e de qualidade superior, foram os principais responsáveis pela utilização de aditivos em panificação. Estes aditivos possuem diversas funções tecnológicas e visam, entre outras funções, facilitar a padronização da qualidade dos produtos finais, prolongar o seu tempo de prateleira, melhorar a sua textura e aparência. Assim, a aplicação de aditivos na panificação é hoje uma prática generalizada em Portugal e em outros países. Contudo, não é conhecido o efeito que esses aditivos podem ter sobre a bioacessibilidade/biodisponibilidade dos minerais. Com efeito, os aditivos alimentares são adicionados devido às suas funções tecnológicas mas não se pode descartar a possibilidade de interferirem com a forma como os minerais são libertados e solubilizados a partir da matriz do pão de modo a poderem ser posteriormente absorvidos.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi o de compreender de que forma diversos aditivos alimentares utilizados correntemente na panificação interferem com a bioacessibilidade dos minerais ferro, cálcio, magnésio, zinco e potássio. O pão utilizado foi o pão de trigo por ser o tipo de pão mais comum em Portugal. Quanto aos aditivos seleccionaram-se o ácido ascórbico, a lecitina, os ésteres monoacetiltartáricos e diacetiltartáricos de mono e diglicéridos de ácidos gordos (E472e) e o mono e diglicéridos de ácidos gordos (E471). A escolha dos aditivos prendeu-se com a sua ampla utilização nos produtos de padaria, nomeadamente nos pães de trigo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes e Enzimas

Na elaboração de todo o trabalho experimental foram utilizados os seguintes reagentes e enzimas: Ácido clorídrico (Panreac, 37%), ácido nítrico (Panreac, 65%), bicarbonato de sódio (Panreac, 99%), bílis bovina desidratada (Fluka Analytical B3883), pancreatina de pâncreas de porco (Sigma P3292), pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma, P7125), padrões comerciais ICP-OES. Na preparação de todas as soluções e diluições utilizou-se sempre água ultra-pura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

2.2. Elaboração das Amostras

Os pães em estudo foram elaborados através do recurso a uma máquina de fazer pão (Becken - Semolina), em que foi escolhido, após experimentação, o programa 3 da máquina automática correspondente a massas de pão integrais. Este programa contempla um pré aquecimento dos ingredientes, uma vez que é utilizado para massas ditas mais pesadas. A seleção na máquina do peso do pão foi para 750g e grau de cozedura máximo, ou seja aumentava ligeiramente o tempo do programa no qual se obtiveram amostras mais semelhantes e próximas do pão branco corrente.

A farinha utilizada foi a farinha de trigo tipo 65 (100% farinha de trigo) sem qualquer adição de aditivos alimentares (informação confirmada junto do fabricante) adquirida numa superfície comercial, a água foi água ultra pura (MilliQ) para que não contribuísse para a introdução de minerais na receita. A levedura escolhida foi a levedura fresca de padeiro por ser também utilizada no fabrico do comum pão comercial. Relativamente ao sal, foi usado sal grosso comum. Tal como referido em relação à levedura, também a opção pelo uso de sal teve por objetivo aproximar o mais possível a receita utilizada àquela que é aplicada vulgarmente no fabrico de qualquer tipo de pão, sendo que a quantidade utilizada permaneceu dentro dos limites legais estabelecidos em Portugal (1,4% do peso do pão, Lei nº75/2009 de 12 de Agosto). Tanto a levedura como o sal utilizados foram adquiridos em superfícies comerciais.

2.2.1. Receita

A receita base utilizada foi definida a partir da fórmula mais simples de fazer pão, utilizando apenas como ingredientes a farinha, água, levedura e sal (tabela 2.1). Na tabela 2.1 os valores estão expressos em percentagem de padeiro, ou seja, considerou-se o peso da farinha como sendo 100%, tendo a percentagem em peso dos restantes ingredientes sido calculada em relação a esse valor (Mondal & Datta, 2008). A percentagem de sal foi reduzida em relação à receita original para que pudesse estar dentro dos parâmetros da legislação portuguesa.

Tabela 2.1: Receita base utilizada na formulação dos pães (adaptada Cauvain & Young, 2006)

| Ingrediente | Quantidade | Percentagem de padeiro |
|----------------------------|------------|------------------------|
| Farinha de trigo | 400 g | 100 % |
| Água ultra-pura | 240 mL | 60 % |
| Levedura fresca de padeiro | 8 g | 2 % |
| Sal | 6 g | 1,5 % |

2.2.2. Elaboração do pão

Mondal & Datta (2008) descrevem três métodos de fabrico de produtos de panificação, o método de massa direta, método de esponja e massa e por último o método “Chorleywood”. Neste estudo o pão foi feito, pelo método da massa direta, dado que todos os ingredientes foram adicionados e misturados num único passo.

2.2.3. Preparação das amostras

Posteriormente à elaboração do pão, e depois de arrefecido naturalmente, o pão foi armazenado individualmente sendo que se efetuavam ambas as digestões no dia seguinte à sua produção. A preparação das amostras consistiu basicamente na redução de uma parte do pão a migalhas, envolvendo miolo e crosta. Este processo foi feito manualmente para que não ocorresse contato do pão com metal ou lâminas que pudessem contribuir para contaminações.

2.3. Formulação dos pães

Foram alvo de estudo 13 diferentes formulações de pão, todos com a receita base referida no ponto 2.1.1. O Pão 1 corresponde apenas à receita base, ou seja neste não foi adicionado nenhum aditivo. Nos restantes pães foram adicionados os aditivos ácido ascórbico, lecitina de soja, ésteres monoacetiltartáricos e diacetiltartáricos de mono e diglicéridos de ácidos gordos (E472e) e mono e diglicéridos de ácidos gordos (E471), de forma isolada ou em combinações. Todos os aditivos utilizados foram gentilmente cedidos por dois fornecedores de aditivos alimentares. As quantidades dos quatro aditivos utilizados correspondem à quantidade normalmente utilizada e ao mínimo que os fabricantes recomendam (informação recolhida junto dos fornecedores). As diferentes composições dos pães são enunciadas na tabela 2.2.

Tabela 2.2: Aditivos adicionados aos diferentes pães ensaiados.

| | Ácido Ascórbico | E471 | E472e | Lecitina |
|---------------|--------------------|------|-------|----------|
| Pão 1 | - | - | - | - |
| Pão 2 | 25 mg/Kg | - | - | - |
| Pão 3 | - | 0,3% | - | - |
| Pão 4 | - | 1% | - | - |
| Pão 5 | - | - | 0,15% | - |
| Pão 6 | - | - | 0,3% | - |
| Pão 7 | - | - | - | 0,15% |
| Pão 8 | - | - | - | 0,3% |
| Pão 9 | 25 mg/Kg | 0,3% | 0,15% | 0,15% |
| Pão 10 | 25 mg/kg | 1% | 0,3% | 0,3% |
| Pão 11 | 25 mg/Kg | 1% | - | - |
| Pão 12 | 25 mg/Kg | - | 0,3% | - |
| Pão 13 | 25 mg/Kg | - | - | 0,3% |

2.4. Digestão Química

Para a digestão química as amostras foram primeiramente reduzidas a cinza ou seja foram sujeitas a uma digestão por via seca. O método de via seca consiste essencialmente na queima da fração orgânica da amostra a elevadas temperaturas pelo oxigénio do ar, que desempenha um papel de agente oxidante, obtendo-se um resíduo inorgânico na forma de cinza solúvel em ácido diluído (Krug, 2006 citado por Ferrarini, 2007). Uma das desvantagens desta técnica é que, quando efetuada de forma aberta a amostra fica exposta à possível contaminação ambiental, o procedimento é demorado, podendo igualmente ocorrer perdas (Kira, 2002). As perdas do analito podem dever-se igualmente à digestão incompleta, uma vez que nesta situação não há a libertação do analito do resíduo carbonáceo (Jorhem, 1995 citado por Kira, 2002). Kira (2002) citando Gouveia *et al.* (2001) refere que a alta estabilidade de alguns compostos orgânicos que podem existir nas amostras ou que se podem formar durante a sua decomposição podem induzir a que ocorra uma oxidação incompleta. No que respeita às vantagens desta técnica encontra-se o facto de ser possível processar grandes quantidades de amostra e dissolver a cinza em pequenos volumes de ácido, o que é muito útil para determinação de pequenas concentrações. Outra vantagem é que a cinza obtida se encontra isenta de matéria orgânica, o que pode ser imperativo para algumas técnicas analíticas (Karadjova, 2002 citado por Kira, 2002).

Para esta análise utilizou-se a digestão por via seca (AOAC, 1990). Assim pesou-se rigorosamente 1 g de amostra (balança Mettler Toledo AB204) para cápsulas de porcelana que foram em seguida colocadas na mufla (Heraeus Electronic) a $550 \pm 50^\circ\text{C}$ e incineradas durante

3 horas e meia, tempo necessário até se obter cinza branca. A cinza obtida após a incineração da amostra corresponde então ao resíduo inorgânico, contendo a fração mineral da amostra. Após arrefecimento da cinza obtida procedeu-se à sua solubilização em ácido de acordo com a metodologia de Vandecasteele & Block (1993). Assim, as cinzas foram digeridas com 10 mL de ácido nítrico 1:1, em banho-maria durante 60 minutos a 95 °C. Findo este tempo e após arrefecimento, as amostras foram filtradas para balões volumétricos de 50 mL e aferidas com água MilliQ. Todas as amostras foram preparadas em triplicado.

2.5. Simulação *in vitro* da Digestão Gastrointestinal

A simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal aplicada no presente estudo foi adaptada do procedimento Navarro *et al.* (2000). Este procedimento envolveu duas etapas, a simulação da digestão gástrica com o uso da pepsina e a digestão intestinal utilizando a pancreatina e bÍlis. Neste processo, adicionaram-se 10 mL de água ultra-pura a 1 g de cada amostra de pão, previamente reduzido a migalhas. O pH desta mistura foi ajustado até 2 com a adição de HCl 1M e, de seguida, adicionou-se a solução de pepsina em HCl 0,1M, para uma proporção final de 0,05 g de pepsina por cada grama de amostra. As amostras foram incubadas durante duas horas numa incubadora orbital (Incubator Shaker Innova 4000) a 37°C, com uma agitação de 110 rpm e no escuro. Findo o tempo de incubação, os digeridos gástricos foram submetidos a uma digestão intestinal, com acerto do seu pH a 6,0 recorrendo a NaHCO₃ 1 M e junção de uma solução mista de pancreatina e bÍlis (0,1 g de pancreatina e 0,625 g de bÍlis em NaHCO₃ 0,1 M), de modo a se obter uma proporção final de 2,5 mL/g de amostra. Em seguida o pH foi ajustado até 7,5 com a adição de NaHCO₃ 1 M e as amostras foram incubadas mais duas horas nas mesmas condições anteriormente descritas. No final as amostras foram imediatamente centrifugadas (centrífuga Sigma-Laboratory Centrifuges 4K15C) durante 30 minutos, a 4°C e 12980 g. No final, os sobrenadantes foram transferidos para cápsulas de porcelana, adicionou-se 1 mL de HNO₃ concentrado (65%) e evaporou-se a amostra até à secura em banho maria a 95°C. Depois de evaporadas as amostras foram secas em estufa (WTB binder E28) a 103±2°C durante 1 hora e meia e incineradas na mufla (Heraeus Electronic) a 550±50 °C até se obter cinza de cor branca. As amostras incineradas foram de seguida solubilizadas em ácido da forma já descrita no procedimento de digestão química (ponto 2.3). Todas as amostras foram preparadas em triplicado. Paralelamente à digestão das amostras realizou-se um ensaio controlo, em que se seguiu todo o procedimento anteriormente descrito para as amostras mas ao qual não se adicionou a amostra (ensaio em branco).

2.6. Doseamento dos metais por espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)

O ICP possui diversas vantagens, tais como o facto de permitir a análise simultânea de diversos elementos, a detecção em ampla faixa de concentrações, elevada precisão, exatidão, sensibilidade e rapidez (Soares *et al.*, 2010). A espectrometria de emissão ótica consiste na emissão de radiação eletromagnética nas regiões do visível e ultra-violeta do espectro eletromagnético (INSA, 2003). O princípio básico desta técnica reside na excitação dos elementos num plasma de árgon, sendo que o plasma é um gás parcialmente ionizado constituído por eletrões, iões e partículas neutras, que pode atingir temperaturas entre os 5000 e 8000 K sendo que a sua energia é mantida externamente por uma fonte de radio-frequência de 27 ou 40MHz (Becker, 2005 citado por Rosini *et al.*, 2006). O plasma é gerado pela passagem de um fluxo de árgon pela tocha de quartzo, nesta ocorrem vários processos (dessolvatação, vaporização, atomização e ionização). As amostras líquidas são introduzidas por um sistema de nebulização onde cerca de 5% do aerossol formado atinge o plasma.

A excitação dos átomos dos elementos ocorre devido à absorção de energia do plasma acoplado indutivamente, voltando ao seu estado fundamental emitindo radiação (INSA, 2003), ou seja a energia dos eletrões e átomos de árgon excitados é usada para a conversão dos átomos e moléculas ao seu estado excitado, quando retornam ao seu estado fundamental emitem fotões os quais são medidos por um sistema de detecção (Becker, 2005, Giné, 1999 citado por Rosini *et al.*, 2006). O espectro emitido é transmitido para um espectrómetro onde é avaliado e decomposto nos respetivos comprimentos de onda (c.d.o.) (INSA, 2003).

Os teores dos minerais presentes nos pães foram determinados por ICP-OES (ICAP-6300/UNICAM). As condições de trabalho em que a análise foi realizada encontram-se descritas na tabela 2.3.

Tabela 2.3: Condições de trabalho em que a análise de ICP-OES foi realizada (INSA, 2003).

| Parâmetro | Condições de trabalho |
|---------------------------------------|-----------------------|
| Fluxo Auxiliar | 0,5 L/minuto |
| Orientação do plasma | Radial e/ou axial |
| Potência da radiofrequência do plasma | 1200 W |
| Velocidade da bomba peristáltica | 50 rpm |
| Tempo de integração no ultravioleta | 15 segundos |
| Tempo de integração no visível | 10 segundos |

Para os minerais analisados foram utilizadas as seguintes linhas de emissão; Zn (c.d.o. 213,856), Ca (c.d.o. 184,006), Mg (c.d.o. 279,553) e K (c.d.o. 769,896). Todas as amostras foram lidas em triplicado.

As curvas de calibração foram elaboradas a partir de soluções padrão mono-elementares de 1000 mg/L, de acordo com os elementos a determinar bem como das concentrações finais pretendidas. Desta solução (solução mãe) advêm as soluções padrão de trabalho. Preparam-se 6 soluções padrão com concentrações conhecidas e 1 branco. Nesta análise foram, então, utilizadas soluções de Fe, Zn, Ca, Mg e K. As concentrações utilizadas na construção da curva de calibração têm em conta a gama de trabalho dos elementos a serem determinados.

Tabela 2.4: Gama de trabalho na determinação de metais no ICP-OES.

| Elemento | Gama de Trabalho (mg/L) |
|----------|-------------------------|
| Potássio | 2,5 – 25mg/L |
| Zinco | 0,05 – 0,5 mg/L |
| Cálcio | 2 – 20 mg/L |
| Magnésio | 1 – 10 mg/L |
| Ferro | 0,05 – 0,5 mg/L |

Na realização desta análise foram utilizados pontos de controlo de qualidade (QC's). Estes pontos têm por objetivo validar a curva de calibração, sendo efetuados da mesma forma que os padrões utilizados na construção da curva, mas partindo de soluções padrão de marca diferente. Para validar as curvas de calibração é então necessário que as concentrações dos QC's coincidam com as estimadas a partir das curvas, utilizando critério de aceitação 10%. Para cada elemento foram lidos QC's com duas concentrações diferentes, de 10 em 10 amostras.

2.7. Análise Estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado com recurso ao Microsoft Office Excel 2007® (Microsoft Corporation, Washington). Em todos os testes-t elaborados foi utilizado um nível de significância de 0,05.

3. Resultados e Discussão

No presente estudo foram elaborados diversos pães com a mesma receita base (farinha, água, sal e levedura), variando o aditivo utilizado e a sua concentração, com o objetivo final de tentar perceber se a utilização destes aditivos influenciava ou não a bioacessibilidade do cálcio, magnésio, potássio, zinco e ferro. Neste estudo não se incluiu o sódio por este ser adicionado sob a forma de sal solúvel (cloreto de sódio) durante a formulação dos pães. Para se atingir o objetivo proposto, efetuou-se a quantificação do total destes minerais presentes nos diversos pães e quantificou-se, igualmente, a quantidade destes minerais que foi solubilizada da matriz do pão por uma simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal, que corresponde à quantidade bioacessível, ou seja passível de ser absorvida pelo organismo. Foram efetuados 13 pães diferentes, codificados de 1 a 13. A composição de cada um deles pode ser consultada na tabela 2.2. No entanto, para facilitar a leitura dos resultados essa mesma codificação encontra-se numa forma desdobrável no Anexo I. O peso final de todos os pães foi de aproximadamente 565g.

3.1. Quantificação do total de minerais nos pães

A quantificação de zinco, magnésio, cálcio, potássio e ferro nos diversos pães, efetuada por ICP-OES após incineração das amostras e solubilização ácida da cinza, encontra-se na tabela 3.1. Os resultados obtidos mostraram, que em todos os pães formulados, o ferro e o zinco foram, dos elementos analisados, os que apresentaram as concentrações mais baixas, representando entre 0,41 e 0,46% do total destes cinco minerais, no caso do zinco, e entre 0,30 e 0,59% no caso de ferro (figura 3.1). Pelo contrário, o potássio foi o mineral que apresentou a concentração mais elevada, representando entre 65,96 a 78,23% do total dos cinco elementos estudados (figura 3.1). O cálcio e o magnésio apresentaram valores intermédios (figura 3.1), representando entre 9,16 e 22,81%, no caso do cálcio, e entre 10,26 e 12,46% do total dos elementos analisados. Esta sequência está de acordo com os valores apresentados na tabela 1.3 (ponto 1.5 da introdução), que mostra os valores aproximados para a composição do pão de trigo. Contudo, os valores dos pães formulados neste trabalho foram sempre inferiores, diferença que pode ter resultado da qualidade e grau de branqueamento da farinha utilizada neste trabalho.

Tabela 3.1: Concentração (mg/100g) total dos minerais nos 13 pães em estudo. Os valores descritos na tabela representam o valor médio e o respectivo desvio padrão.

| | Zinco | Magnésio | Cálcio | Potássio | Ferro |
|---------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------|
| Pão 1 | 0,57 ^a ± 0,08 | 17,42 ^{ab} ± 0,33 | 14,85 ^c ± 0,81 | 106,4 ^a ± 1,7 | 0,49 ^{acde} ± 0,09 |
| Pão 2 | 0,58 ^a ± 0,02 | 17,63 ^{ab} ± 0,72 | 16,75 ^c ± 2,86 | 111,4 ^a ± 3,4 | 0,45 ^{cde} ± 0,06 |
| Pão 3 | 0,54 ^a ± 0,02 | 17,23 ^{ab} ± 0,51 | 14,98 ^c ± 1,90 | 109,4 ^a ± 3,3 | 0,56 ^{acej} ± 0,03 |
| Pão 4 | 0,54 ^a ± 0,04 | 16,91 ^{ab} ± 0,63 | 13,86 ^c ± 1,17 | 109,7 ^a ± 2,5 | 0,55 ^{acdj} ± 0,01 |
| Pão 5 | 0,55 ^a ± 0,01 | 17,14 ^{ab} ± 0,64 | 26,59 ^b ± 1,01 | 114,3 ^a ± 3,7 | 0,75 ^{acdej} ± 0,16 |
| Pão 6 | 0,54 ^a ± 0,02 | 17,53 ^{ab} ± 0,02 | 38,78 ^a ± 0,91 | 112,1 ^a ± 3,3 | 1,00 ^{bfhj} ± 0,08 |
| Pão 7 | 0,52 ^a ± 0,01 | 17,17 ^{ab} ± 0,51 | 13,55 ^c ± 1,63 | 110,0 ^a ± 2,8 | 0,75 ^{acdej} ± 0,15 |
| Pão 8 | 0,52 ^a ± 0,04 | 17,43 ^{ab} ± 0,78 | 13,37 ^c ± 2,41 | 114,3 ^a ± 0,9 | 0,46 ^{efk} ± 0,02 |
| Pão 9 | 0,52 ^a ± 0,01 | 17,02 ^b ± 0,18 | 14,20 ^c ± 1,32 | 108,8 ^a ± 2,7 | 0,72 ^{acdej} ± 0,06 |
| Pão 10 | 0,55 ^a ± 0,02 | 17,93 ^{ab} ± 0,67 | 38,66 ^a ± 1,67 | 116,6 ^a ± 0,8 | 0,75 ^{acdej} ± 0,14 |
| Pão 11 | 0,55 ^a ± 0,05 | 17,29 ^{ab} ± 0,25 | 14,94 ^c ± 1,38 | 106,4 ^a ± 4,0 | 0,49 ^{acde} ± 0,06 |
| Pão 12 | 0,58 ^a ± 0,02 | 18,20 ^a ± 0,23 | 39,69 ^a ± 1,30 | 116,8 ^a ± 3,7 | 0,86 ^{bfi} ± 0,05 |
| Pão 13 | 0,56 ^a ± 0,04 | 17,10 ^{ab} ± 0,33 | 14,75 ^c ± 0,67 | 106,9 ^a ± 4,5 | 0,69 ^{hik} ± 0,03 |

Na mesma coluna letras diferentes significam valores significativamente diferentes (p<0,05).

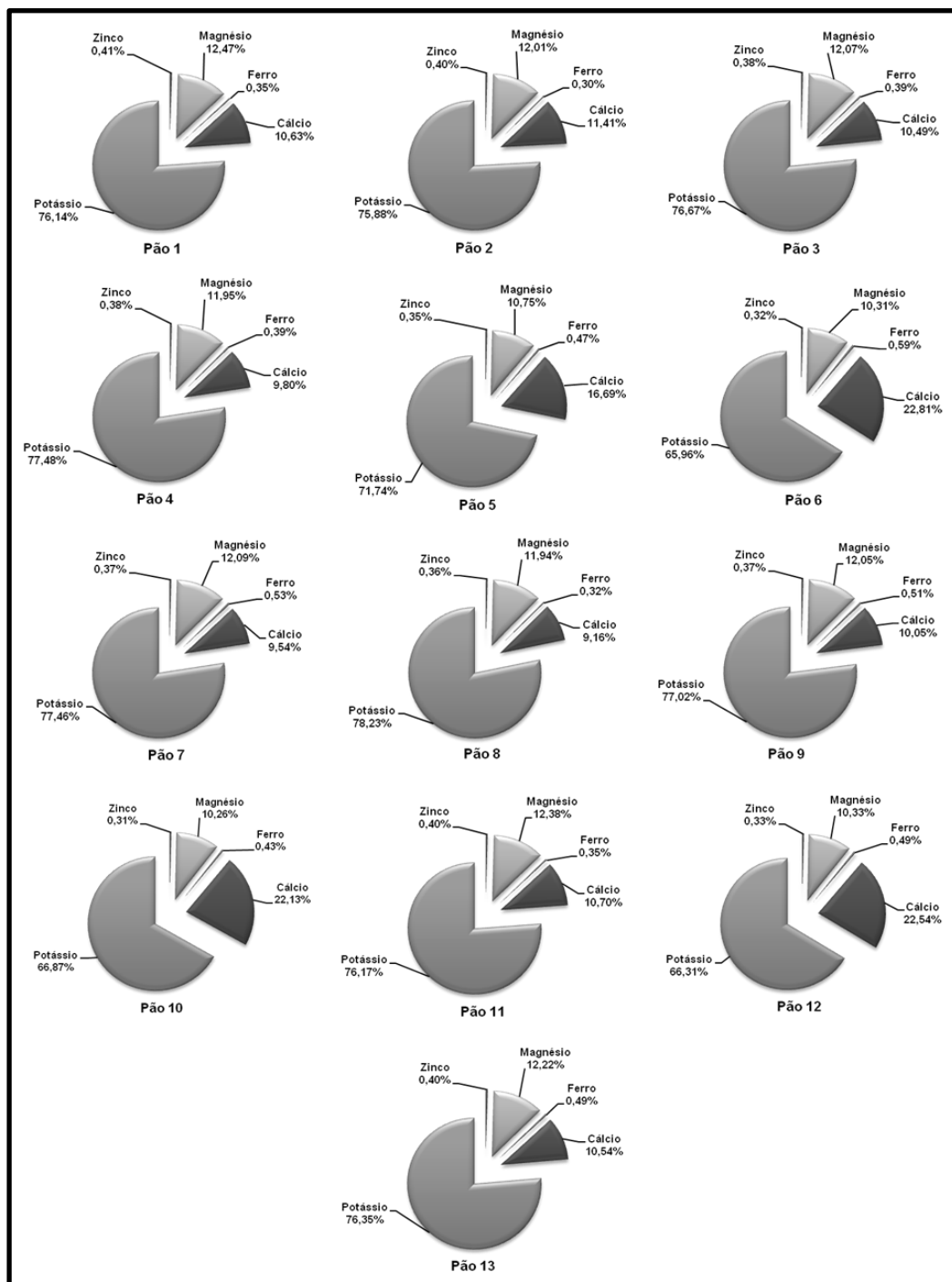


Figura 3.1: Contribuição percentual do zinco, ferro, magnésio, cálcio e potássio para o total destes cinco minerais quantificados nos pães 1 a 13.

Para uma visualização mais facilitada dos resultados expressos na tabela anterior (Tabela 3.1), são seguidamente demonstrados os mesmos resultados sob a forma de histograma para cada mineral.

O teor em zinco oscilou entre os 0,52 e os 0,58 mg/100g, (figura 3.2) nos vários pães formulados. Contudo, as diferenças observadas no teor deste mineral nunca foram estatisticamente significativas, pelo que se pode concluir que os vários aditivos adicionados, pelo menos nas doses em que foram utilizados, não contribuem para aumentar os níveis de zinco do pão. O mesmo é verdade para o magnésio e para o potássio. No caso do magnésio (figura 3.3) os valores oscilaram entre 16,91 e os 18,20 mg/100 g e no caso do potássio (figura 3.4) entre os 106,4 e os 116,8 mg/100 g.

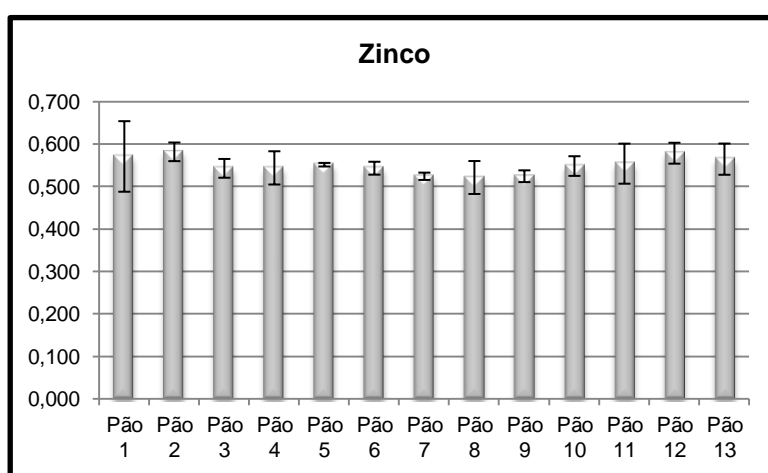


Figura 3.2: Concentração média de zinco nos 13 pães formulados em mg/100g. As barras de erro representam o desvio padrão.

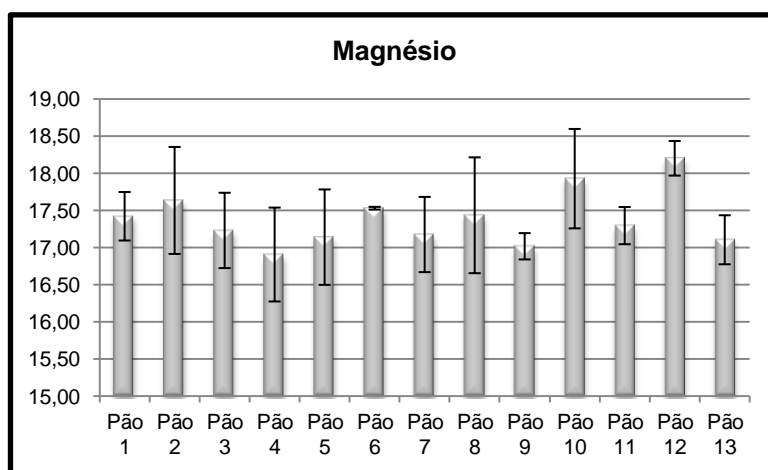


Figura 3.3: Concentração média de magnésio nos 13 pães formulados em mg/100g. As barras de erro representam o desvio padrão.

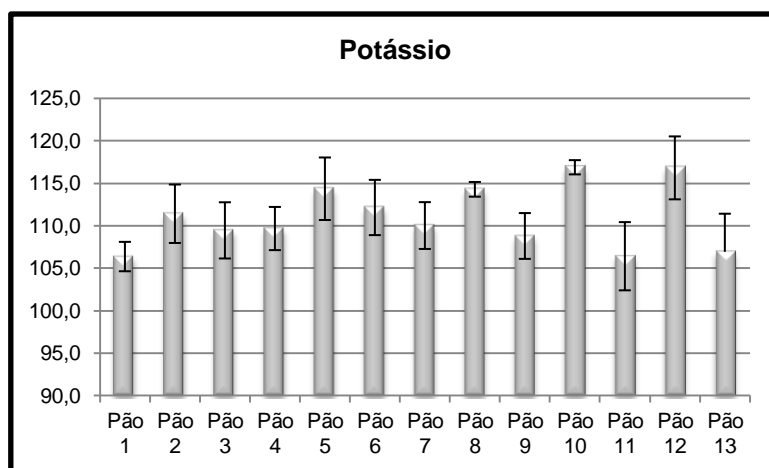


Figura 3.4: Concentração média de potássio nos 13 pães formulados em mg/100g. As barras de erro representam o desvio padrão.

Resultados diferentes foram obtidos no caso do cálcio. Com efeito, neste caso foi possível observar que a adição do aditivo E472e levava a um aumento significativo do teor em cálcio, especialmente nos casos em que se utilizou a quantidade mais elevada deste aditivo (pães 6, 10 e 12) (figura 3.5). Este facto resulta do aditivo E472e (DATEM) possuir na sua composição carbonato de cálcio. O carbonato de cálcio é adicionado a este aditivo como antiaglomerante. Sem esta adição, o E472e seria muito difícil de utilizar devido à sua consistência e rigidez (informação fornecida pelo fornecedor). Esta quantidade de cálcio que provém do aditivo é espelhada no teor em cálcio dos pães que o possuam na sua formulação.

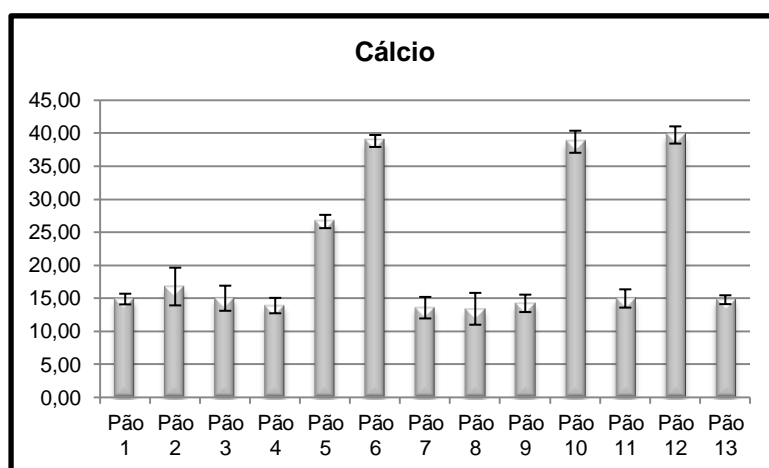


Figura 3.5: Concentração média de cálcio nos 13 pães formulados em mg/100g. As barras de erro representam o desvio padrão.

Em relação ao ferro os valores apresentaram algumas variações com significado estatístico (figura 3.6). Contudo, não se consegue definir uma tendência clara nessas variações. Os resultados sugerem que o E472e também possa conter algum ferro na sua composição, uma vez que se verificou uma tendência para os pães que contêm este aditivo apresentarem valores mais elevados deste mineral.

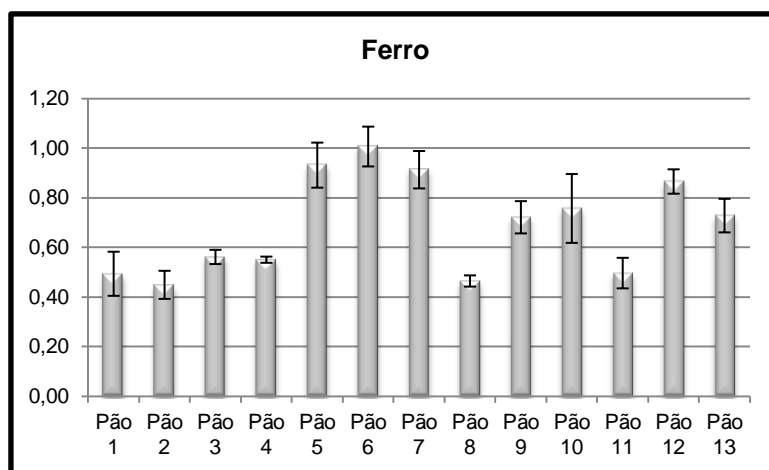


Figura 3.6: Concentração média de ferro nos 13 pães formulados em mg/100g. As barras de erro representam o desvio padrão.

Concluindo, a análise da composição mineral dos treze pães formulados revelou que, a composição destes nos elementos analisados se manteve, de uma forma geral, constante, apresentando apenas algumas variações no teor em ferro e, nos pães contendo doses mais elevadas de E472e, variações mais acentuadas no teor cálcio.

3.2. Quantificação dos minerais extraídos pela simulação da digestão gastrointestinal

A quantidade de minerais que fica em solução no final da digestão *in vitro* visa traduzir a quantidade de minerais que é solubilizada a partir da matriz do pão, durante a digestão gastrointestinal. Assim, a fração de minerais que é solubilizada durante a digestão *in vitro* dos vários pães, por ação quer do pH quer das enzimas digestivas, simula a fração que fica acessível para poder ser, posteriormente, absorvida e utilizada pelo organismo. Desta forma, a comparação dos resultados obtidos neste ponto do trabalho com os resultados obtidos no ponto anterior permite calcular as percentagens de bioacessibilidade dos vários minerais nos vários pães.

Os resultados respeitantes ao doseamento dos minerais solubilizados durante as digestões *in vitro* encontram-se na tabela 3.2. Nesta tabela não são apresentados os resultados respeitantes ao ferro por estes terem apresentado total ausência de reprodutibilidade entre os vários replicados. Esta interferência deve, possivelmente, ter resultado de contaminações externas durante a preparação das amostras.

No branco da digestão *in vitro* foram detetados todos os metais em análise. Assim, o branco apresentou $0,076 \pm 0,014$ mg/L de zinco; $1,89 \pm 0,04$ de magnésio; $4,04 \pm 0,08$ de cálcio e $16,5 \pm 1,1$ de potássio. Muito provavelmente a fonte de todos estes metais no branco terá sido a bílis bovina desidratada que foi utilizada durante a simulação da digestão intestinal. Desta forma, foi necessário descontar a interferência do branco a todas as amostras.

Ao contrário do que se verificou na quantificação do teor total de cada metal, na quantificação do teor dos metais solubilizados no decurso da digestão *in vitro*, verificou-se uma pior concordância de resultados entre replicados, que levou a desvios padrão relativamente elevados, retirando robustez aos resultados e solidez às conclusões. Este facto pode, pelo menos em parte, ter resultado do procedimento de digestão *in vitro* ser mais suscetível de ser afetado por erros experimentais, por ser um procedimento experimental longo e com muitos passos. No entanto, este facto pode também ter resultado do nível de metais existente nos brancos. A variação entre replicados foi menos notória no caso do magnésio, possivelmente por ser o caso em que se verificou uma maior distância entre o nível de metais no branco e nas amostras.

Os resultados serão analisados comparando a fração bioacessível dos minerais do pão sem aditivos com a fração bioacessível dos minerais dos restantes pães, tentando, desta forma, identificar o efeito de cada um dos aditivos ou das suas combinações sobre a solubilização dos minerais do pão.

A comparação dos valores apresentados nas tabelas 3.1 e 3.2 permite verificar que os valores obtidos após a digestão *in vitro* foram, na sua grande maioria, inferiores aos valores obtidos através da digestão química, o que mostra que os minerais presentes nos pães não conseguiram ser totalmente solubilizados durante a simulação da digestão gastrointestinal efetuada. Este assunto será abordado no próximo ponto onde serão calculadas as percentagens de bioacessibilidade para os vários elementos.

Tabela 3.2: Concentração (mg/100g) de minerais nos 13 pães em estudo solubilizada pela digestão *in vitro*. Os valores descritos na tabela representam o valor médio e o respetivo desvio padrão.

| | Zinco | Magnésio | Cálcio | Potássio |
|---------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Pão 1 | 0,326 ^b ± 0,015 | 17,14 ^a ± 1,09 | 15,24 ^a ± 0,35 | 39,99 ^a ± 3,28 |
| Pão 2 | 0,383 ^a ± 0,013 | 15,59 ^a ± 1,32 | 12,14 ^b ± 0,60 | 76,04 ^a ± 13,04 |
| Pão 3 | 0,274 ^b ± 0,047 | 11,62 ^b ± 0,74 | - | 45,58 ^a ± 1,72 |
| Pão 4 | 0,203 ^b ± 0,059 | 12,83 ^b ± 1,68 | 6,55 ^b ± 1,65 | 42,77 ^a ± 5,69 |
| Pão 5 | 0,211 ^b ± 0,067 | 12,34 ^b ± 1,03 | 8,59 ^b ± 0,02 | 38,55 ^a ± 3,86 |
| Pão 6 | 0,178 ^c ± 0,022 | 11,56 ^b ± 0,71 | 14,69 ^a ± 0,59 | 39,72 ^a ± 4,87 |
| Pão 7 | 0,315 ^b ± 0,063 | 12,23 ^b ± 1,34 | 7,91 ^b ± 2,07 | 47,87 ^a ± 5,63 |
| Pão 8 | 0,275 ^b ± 0,013 | 12,67 ^b ± 0,87 | 7,00 ^b ± 1,29 | 35,11 ^a ± 3,49 |
| Pão 9 | 0,201 ^b ± 0,005 | 12,05 ^b ± 0,38 | 0,31 ^b ± 0,01 | 47,51 ^a ± 7,86 |
| Pão 10 | 0,172 ^c ± 0,053 | 11,44 ^b ± 0,69 | 0,83 ^b ± 0,21 | 38,04 ^a ± 6,79 |
| Pão 11 | 0,191 ^b ± 0,066 | 11,11 ^b ± 0,71 | 1,38 ^b ± 0,78 | 44,58 ^a ± 8,22 |
| Pão 12 | 0,138 ^c ± 0,035 | 11,45 ^b ± 0,24 | 16,33 ^a ± 1,02 | 35,93 ^a ± 8,78 |
| Pão 13 | 0,265 ^b ± 0,027 | 10,51 ^b ± 0,38 | 2,30 ^b ± 0,18 | 45,39 ^a ± 12,51 |

Na mesma coluna letras diferentes significam valores significativamente diferentes em relação ao pão 1 ($p < 0,05$).

Para uma visualização mais facilitada dos resultados expressos na tabela anterior (Tabela 3.2), são seguidamente demonstrados os mesmos resultados sob a forma de histograma para cada mineral.

Em relação ao zinco (figura 3.7), os valores de concentração estimados a partir das digestões *in vitro*, oscilaram entre os 0,383 mg/100g para o pão 2 e os 0,138 mg/100g para o pão 12.

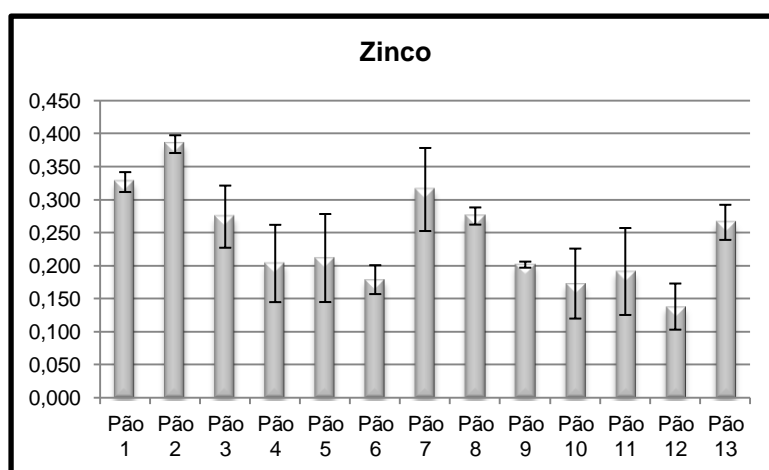


Figura 3.7: Concentração média de zinco nos 13 pães formulados estimada a partir das digestões *in vitro* em mg/100g. As barras de erro representam o desvio padrão.

Dos vários pães elaborados apenas quatro foram significativamente diferentes do pão sem aditivos (pão 1). Assim, o pão com 25 ppm de ácido ascórbico (pão 2) apresentou o valor mais

elevado, enquanto que os pães em cuja formulação se utilizou a quantidade mais elevada de E472e (pães 6, 10 e 12) apresentaram concentrações mais baixas. O pão 2 para além de ter sido estatisticamente diferente do pão 1 foi igualmente estatisticamente superior a todos os outros pães (com exceção do pão 7) o que aponta no sentido do ácido ascórbico poder ajudar na solubilização do zinco, especialmente quando se encontra isolado, uma vez que, este aumento não se verificou nos pães em que o ácido ascórbico foi utilizado em associação com outros aditivos. Uma vez que o ácido ascórbico é pouco estável à temperatura e, portanto, deve degradar-se durante a cozedura do pão, o efeito exercido por este composto deverá ter resultado da sua ação na fase inicial de preparação do pão, antes de se iniciar o aquecimento.

Em relação aos pães em que se utilizou a dose mais elevada (0,3%) de E472e verificou-se uma diminuição da solubilização do zinco, quer quando este aditivo foi utilizado isoladamente (pão 6), em associação com o ácido ascórbico (pão 12) ou em associação como ácido ascórbico, E471 e lecitina (pão 10). Este resultado, pode advir deste aditivo interferir diretamente com o zinco ou de interferir com outros constituintes do pão, resultado desta interação uma menor solubilização deste elemento. Outra possível explicação pode resultar do teor mais elevado em cálcio que estes pães apresentam (tabela 3.1 e figura 3.5). Com efeito, vários trabalhos descrevem a existência de interações negativas entre a absorção do cálcio e do zinco (Larsen & Sandstrom, 1992; Sandstrom, 2001). Em particular, Sandstrom (2001) refere que quando o cálcio se encontra na presença de fitatos, como é o caso do pão, pode induzir uma maior precipitação de fitato de zinco.

Os resultados obtidos com o magnésio (tabela 3.2 e figura 3.8) oscilaram entre os 17,14 mg/100g para o pão 1 e os 10,51 mg/100g para o pão 13.

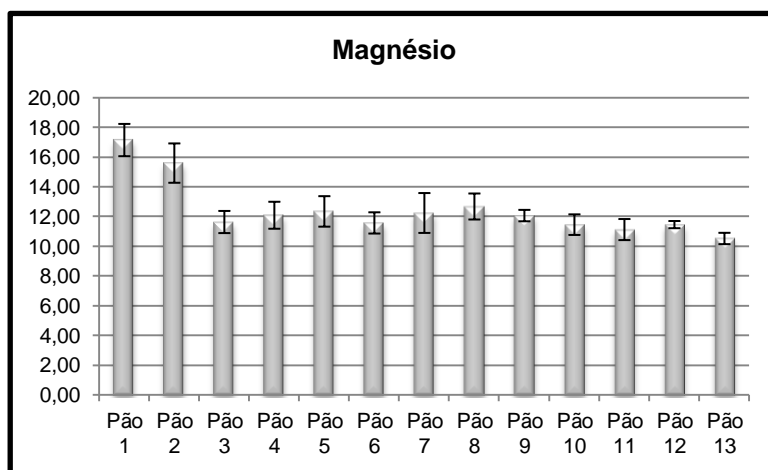


Figura 3.8: Concentração média de magnésio nos 13 pães formulados estimada a partir das digestões *in vitro* em mg/100g. As barras de erro representam o desvio padrão.

Em relação a este elemento verificou-se que, com exceção do ácido ascórbico cuja adição não levou à existência de diferenças significativas em relação ao pão 1, a adição de todos os outros aditivos levou a uma diminuição significativa da sua solubilização. Assim, a lecitina, o E471 e o

E472e, quer isoladamente, quer em combinação com o ácido ascórbico diminuíram a bioacessibilidade do magnésio, nas condições ensaiadas. Mais uma vez, este resultado pode advir destes aditivos, interferirem diretamente com o magnésio ou de interferirem com outros constituintes do pão, resultado desta interação uma menor solubilização deste elemento.

Os resultados para o potássio oscilaram entre os 35,11 para o pão 8 e os 76,04 para o pão 2 (figura 3.9). Contudo nenhum dos pães foi significativamente diferente do pão 1, o que parece revelar que nenhum dos aditivos utilizados nas formulações dos pães influenciou a solubilização do potássio. Também entre os outros pães não se detetaram diferenças estatisticamente relevantes. Assim, à semelhança do verificado para na quantificação do potássio total, também na quantificação do potássio solubilizado pelas digestões *in vitro* as amostras foram todas semelhantes entre si.

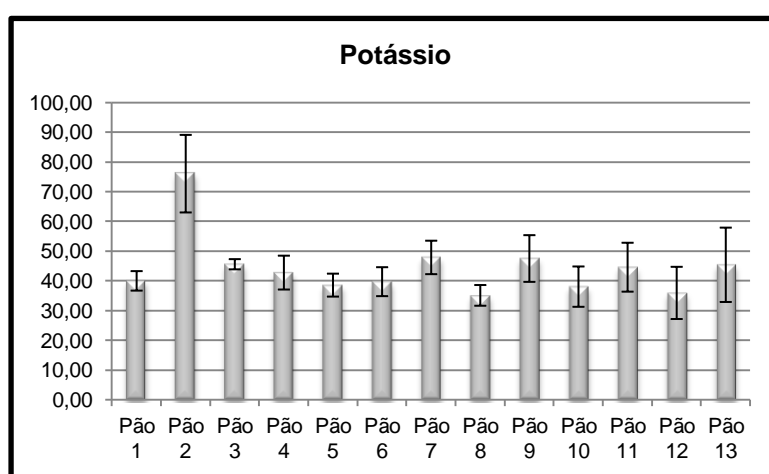


Figura 3.9: Concentração média de potássio nos 13 pães formulados estimada a partir das digestões *in vitro* em mg/100g. As barras de erro representam o desvio padrão.

Os resultados obtidos com o cálcio (tabela 3.2 e figura 3.10) apresentaram grandes variações oscilando entre os 16,33 mg/100g para o pão 12 e os 0,31 mg/100g para o pão 9. Apenas os pães 6 (dose mais elevada de E472e) e 12 (ácido ascórbico e dose mais elevada de E472e) não apresentaram um teor em cálcio significativamente inferior ao do pão sem aditivos (pão 1). No entanto, estes pães (6 e 12) tinham um teor em cálcio total superior ao do pão 1 (tabela 3.1), o facto, de após a digestão *in vitro*, terem apresentado um valor igual pode significar ou que o cálcio proveniente do aditivo não é bioacessível ou que a presença do aditivo levou a uma diminuição da solubilização do cálcio do pão, não sendo visível uma diferença em relação ao pão 1 devido ao acréscimo de cálcio proveniente do próprio aditivo.

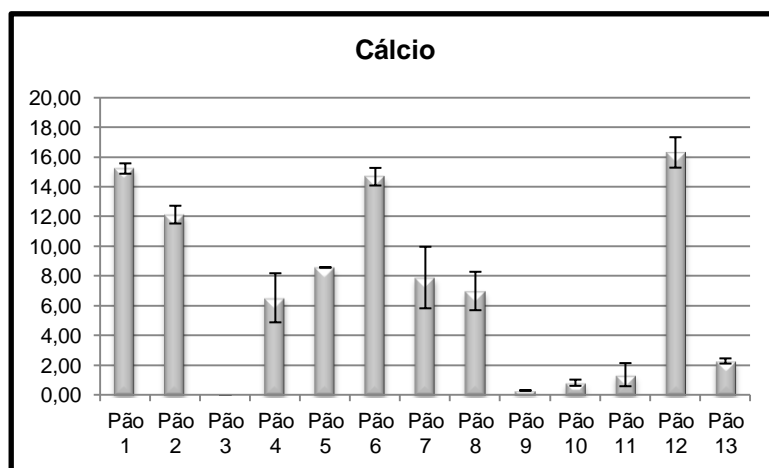


Figura 3.10: Concentração média de cálcio nos 13 pães formulados estimada a partir das digestões *in vitro* em mg/100g. As barras de erro representam o desvio padrão.

No caso dos pães formulados com adição de lecitina (pães 7 e 8) ou de E471 (pão 4) foi visível uma diminuição do cálcio solubilizado no decurso da digestão *in vitro*. Esta diminuição foi mais acentuada no caso em que estes aditivos foram adicionados em conjunto com o ácido ascórbico (pães 11 e 13) e mais acentuada ainda nos pães formulados com combinações de todos os aditivos (pães 9 e 10). No caso do pão 10, nem a presença do cálcio proveniente do E472e conseguiu compensar o efeito dos aditivos. Desta forma, os resultados apontam no sentido de todos os aditivos utilizados, em especial a lecitina e o E471, poderem condicionar a bioacessibilidade do cálcio, sendo esse efeito mais acentuado quando os aditivos se encontram em presença uns dos outros. Mais uma vez, esta diminuição da bioacessibilidade pode resultar dos aditivos interferirem diretamente com o cálcio ou de interferirem com outros constituintes do pão, resultado desta interação uma menor solubilização deste elemento.

Para validar os resultados da extração *in vitro*, foi efetuada a análise aos minerais presentes no pellet do pão 2, ou seja foi efetuada a análise à fração não solubilizada durante a digestão *in vitro*. Os resultados mostraram que a soma do teor em cada um dos metais nas frações não solubilizada e solubilizada resultantes da digestão *in vitro* (após a subtração dos respetivos brancos) foi semelhante ao teor total de cada um dos metais (figura 3.11). A melhor concordância foi obtida para o potássio, com um valor exatamente igual, seguida do magnésio, zinco e, por fim, o cálcio. A soma do teor nas frações solubilizada e não solubilizada para estes três últimos metais foi sempre superior ao respetivo teor total determinado. Contudo, mesmo nos casos em que os valores não foram iguais verificou-se sempre interpenetração das barras de erro, o que mostra que os valores se encontram dentro dos mesmos intervalos de variação.

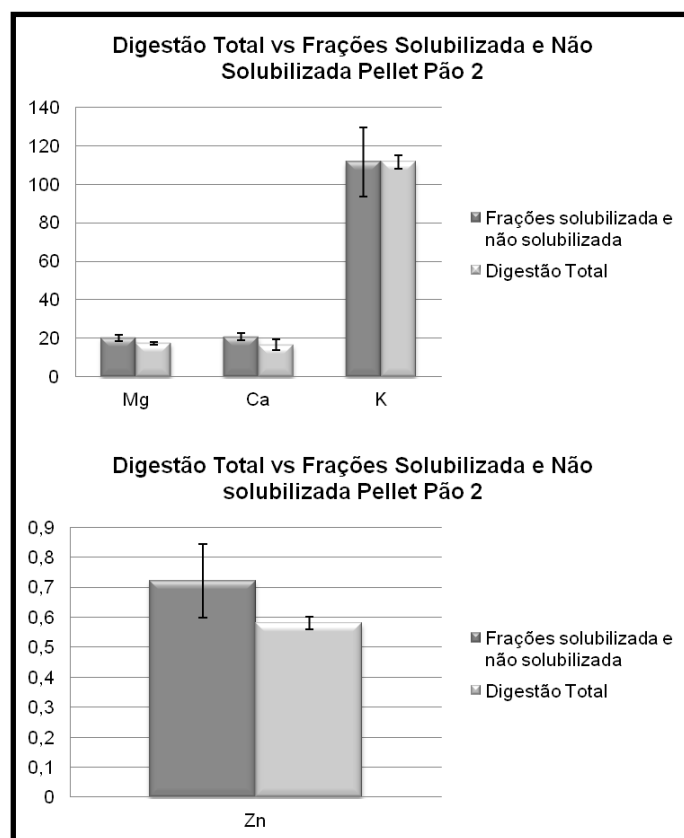


Figura 3.11: Teor em Zn, Mg, Ca e K nas frações solubilizada e não solubilizada obtidas após a digestão *in vitro* do pão 2 e total de cada metal quantificado no pão 2 em mg/100g. As barras de erro representam o desvio padrão.

3.3. Determinação da Percentagem de Bioacessibilidade

A percentagem de bioacessibilidade representa a percentagem da concentração total de cada mineral existente nos pães que ficou solubilizada (bioacessível) após a simulação da digestão gastrointestinal. Esta percentagem foi calculada tendo por base a seguinte fórmula adaptada de Tokalioglu *et al.*, 2014:

$$FB = (FMB \div CTM) \times 100$$

Em que FB é a fração bioacessível expressa em %, FMB corresponde à quantidade de mineral aferida após a digestão *in vitro* (mg/100g) e CTM à concentração de mineral existente no pão (mg/100g). Os valores da percentagem de bioacessibilidade por pão e por mineral encontram-se na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Percentagem de bioacessibilidade do Zn, Mg, Ca e K nos 13 pães. Os valores descritos na tabela representam o valor médio e o respetivo desvio padrão.

| | Zinco | Magnésio | Cálcio | Potássio |
|---------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Pão 1 | 57,1 ^b ± 2,6 | 98,4 ^a ± 6,2 | 102,6 ^a ± 2,4 | 37,6 ^a ± 3,1 |
| Pão 2 | 66,6 ^a ± 2,3 | 88,4 ^a ± 7,5 | 72,5 ^b ± 3,6 | 68,3 ^a ± 11,7 |
| Pão 3 | 50,4 ^b ± 8,7 | 67,5 ^b ± 4,3 | - | 41,6 ^a ± 1,6 |
| Pão 4 | 37,3 ^b ± 10,8 | 71,4 ^b ± 5,4 | 47,2 ^b ± 11,9 | 39,0 ^a ± 5,2 |
| Pão 5 | 38,3 ^b ± 12,1 | 72,0 ^b ± 6,0 | 32,3 ^b ± 0,1 | 33,7 ^a ± 3,4 |
| Pão 6 | 32,8 ^c ± 4,0 | 66,0 ^b ± 4,1 | 37,9 ^b ± 1,5 | 35,4 ^a ± 4,3 |
| Pão 7 | 60,0 ^b ± 12,0 | 71,2 ^b ± 7,8 | 58,4 ^b ± 15,3 | 40,7 ^a ± 1,9 |
| Pão 8 | 52,7 ^b ± 2,5 | 72,6 ^b ± 5,0 | 52,4 ^b ± 9,7 | 29,5 ^b ± 2,3 |
| Pão 9 | 38,3 ^b ± 0,9 | 70,8 ^b ± 2,3 | 2,2 ^b ± 0,0 | 41,0 ^a ± 6,0 |
| Pão 10 | 31,4 ^c ± 9,7 | 63,8 ^b ± 3,9 | 2,2 ^b ± 0,5 | 32,6 ^a ± 5,8 |
| Pão 11 | 34,3 ^b ± 11,9 | 64,3 ^b ± 4,1 | 9,2 ^b ± 5,2 | 41,9 ^a ± 7,7 |
| Pão 12 | 23,8 ^c ± 6,0 | 62,9 ^b ± 1,3 | 41,1 ^b ± 2,6 | 30,8 ^a ± 7,5 |
| Pão 13 | 44,3 ^b ± 4,7 | 61,5 ^b ± 2,2 | 15,6 ^b ± 1,2 | 42,5 ^a ± 11,7 |

Na mesma coluna letras diferentes significam valores significativamente diferentes em relação ao pão 1 ($p < 0,05$).

Os resultados mostraram que, em relação ao pão sem aditivos (pão 1) os minerais com melhor percentagem de bioacessibilidade foram o cálcio e o magnésio, com percentagens próximas dos 100%, sendo o potássio aquele que apresentou a menor percentagem de bioacessibilidade, ficando apenas 38% do total deste mineral existente no pão disponível para posterior absorção. Foi possível verificar que, dos quatro elementos em análise, a bioacessibilidade do cálcio foi a mais afetada pela presença dos aditivos e a do potássio a menos afetada. Assim, as percentagens de bioacessibilidade para o cálcio variaram de 100% no pão 1 até cerca de 2% nos pães 9 e 10, enquanto que as percentagens de bioacessibilidade para o potássio não apresentaram na generalidade diferenças significativas. O magnésio foi o mineral que apresentou, para a generalidade dos pães, valores mais elevados de percentagem de bioacessibilidade, com valores sempre superiores a 60%. Contudo, devido à quantidade elevada em que o potássio se encontra nos pães (tabela 3.1) ele continua a ser o mineral maioritário no final da digestão in vitro, mesmo tendo percentagens de bioacessibilidade inferiores à do magnésio.

Para uma visualização mais facilitada dos resultados expressos na tabela anterior (Tabela 3.3), são seguidamente demonstrados os mesmos resultados sob a forma de histograma para cada mineral.

Analisando as percentagens de bioacessibilidade para o zinco (figura 3.12) é notório que o pão 2 foi o que apresentou o valor mais elevado, e os pães com a dose mais elevada de E472e (pães 6, 10 e 12) os valores mais baixos. Estes quatro pães (2, 6, 10 e 12) foram os únicos que apresentaram percentagens de bioacessibilidade significativamente diferentes das do pão 1.

Assim, tal como já se tinha referido no ponto anterior o ácido ascórbico isoladamente parece facilitar a solubilização do zinco, enquanto que o E472e a parece dificultar, possivelmente devido à interferência entre o zinco e o cálcio. Contudo, quando conjugado com o E471 ou com a lecitina, não é visível o efeito benéfico do ácido ascórbico sobre a solubilização do zinco.

Comparando os restantes aditivos, a lecitina parece ser aquele que menos afeta a solubilização do zinco, uma vez que o pão 8 (teor mais elevado em lecitina) apresentou uma percentagem de bioacessibilidade significativamente superior à do pão 6 (teor mais elevado em E472e) e o pão 13 (ácido ascórbico e teor mais elevado em lecitina) uma percentagem de bioacessibilidade significativamente superior à do pão 12 (ácido ascórbico e teor mais elevado em E472e).

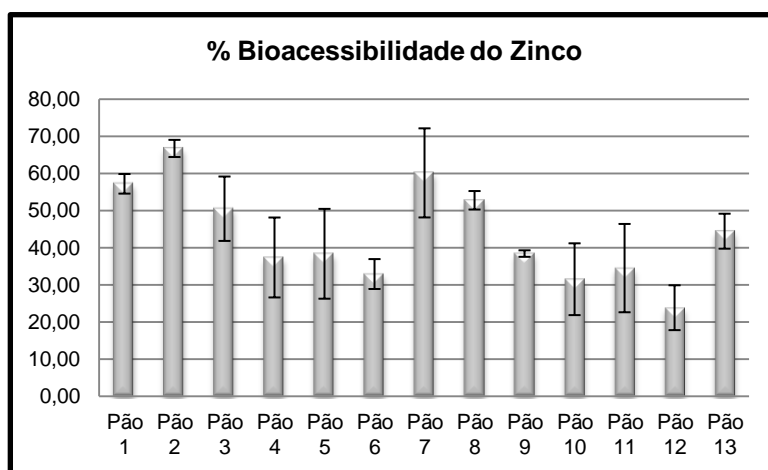


Figura 3.12: Percentagem de bioacessibilidade do zinco nos 13 pães em análise. As barras de erro representam o desvio padrão.

A percentagem de bioacessibilidade do magnésio para todos os pães (figura 3.13) situou-se sempre acima dos 60%, sendo que o pão 1 (pão sem aditivos) foi o que maior percentagem apresentou com 98,4%. Em relação ao efeito dos aditivos verificou-se que o ácido ascórbico isoladamente não levou a uma diminuição significativa da percentagem de bioacessibilidade deste mineral, mas todos os outros aditivos, ou combinações de aditivos, incluindo as combinações com ácido ascórbico, levaram a diminuições significativas desta percentagem. Em relação aos restantes aditivos, apenas os pães 5, 7, 8 e 9 não apresentaram uma percentagem de bioacessibilidade para o magnésio inferior à do pão 2. Uma vez que os pães 7 e 8 são os pães onde se adicionou lecitina, este resultado pode sugerir que este aditivo seja o que menos afeta a solubilização do magnésio.

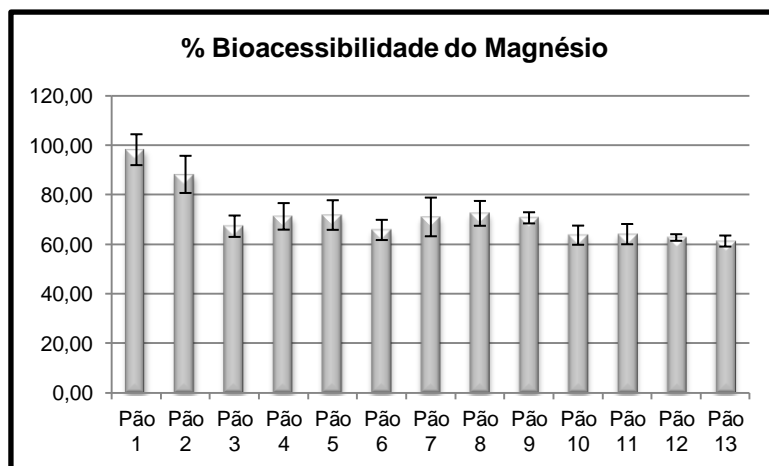


Figura 3.13: Percentagem de bioacessibilidade do magnésio nos 13 pães em análise. As barras de erro representam o desvio padrão.

Conforme já anteriormente referido o cálcio foi o mineral onde se registaram maiores oscilações das percentagens de bioacessibilidade em função da formulação dos pães. Assim, para este metal, as percentagens de bioacessibilidade variaram entre os cerca de 100% para o pão 1 e os 2,2% para os pães 9 e 10, ou seja para os pães que contêm combinações de todos os aditivos (figura 3.14).

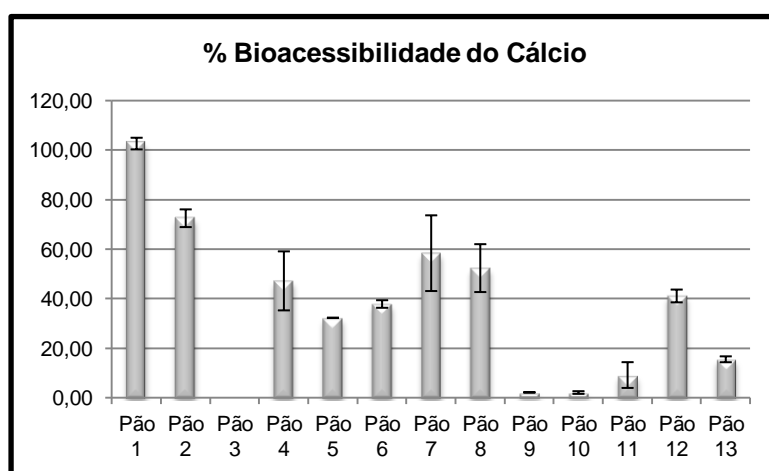


Figura 3.14: Percentagem de bioacessibilidade do cálcio nos 13 pães em análise. As barras de erro representam o desvio padrão.

O pão 1 apresentou uma percentagem de bioacessibilidade para o cálcio significativamente superior à de todos os outros pães. Embora os pães 6 e 12 tenham apresentado uma quantidade de cálcio na fração solúvel idêntica à do pão 1 (tabela 3.2), apresentaram uma percentagem de bioacessibilidade significativamente inferior visto terem um maior teor em cálcio total (tabela 3.1). Assim, embora o cálcio seja parte integrante da constituição do E472e, e que esse incremento tenha sido comprovado na quantificação do cálcio total, esse cálcio adicional não se traduziu numa mais-valia em relação ao cálcio bioacessível. Assim, a maior

quantidade de cálcio presente nos pães 6 e 12 não foi espelhada na quantidade de cálcio solúvel passível de ser absorvida pelo organismo.

Os resultados mostraram, que de todos os aditivos testados, o ácido ascórbico foi o que menos afetou a solubilização do cálcio, apresentando o pão 2 uma percentagem de bioacessibilidade significativamente superior à de todos os pães 4 a 13. Nos pães com os aditivos E471 (pão 4), E472e (pão 5 e 6), lecitina (pão 7 e 8) e com ácido ascórbico e E472e (pão 12) o cálcio apresentou uma percentagem de bioacessibilidade que rondou os 30 a 50%, ou seja uma queda para menos de metade do valor apresentado pelo pão 1. O efeito dos aditivos E471 e lecitina foi ainda mais acentuado quando estes se encontraram em combinação com o ácido ascórbico (pães 11 e 13), tendo, neste caso, o cálcio apresentado percentagens de bioacessibilidade entre os 10 e os 20%. Este efeito de associação com o ácido ascórbico não se verificou com o E472e, uma vez que a percentagem de bioacessibilidade do cálcio foi semelhante nos pães 6 (0,3% de E472e) e 12 (0,3% de E472e e 25 ppm de ácido ascórbico). O uso de todos os aditivos de forma conjugada (pães 9 e 10) foi aquele que afetou de forma mais drástica a solubilização do cálcio, tendo-se obtido percentagens de solubilização de apenas cerca de 2%.

Os resultados obtidos para o potássio mostraram que este mineral tem uma bioacessibilidade de cerca de 40% no pão sem aditivos. Assim, este mineral, quando comparado com o cálcio e com o magnésio, foi pouco solubilizado no decurso da simulação da digestão gastrointestinal efetuada. Conforme já anteriormente referido, devido à quantidade elevada em que este se encontra nos pães (tabela 3.1) ele continua a ser o mineral maioritário no final da digestão *in vitro*. Em relação ao efeito dos aditivos (figura 3.15), apesar de se terem verificado algumas diferenças nas percentagens de bioacessibilidade essas diferenças não foram de um modo geral significativas, o que aponta no sentido da bioacessibilidade deste mineral ser pouco afetada pelos vários aditivos em estudo.

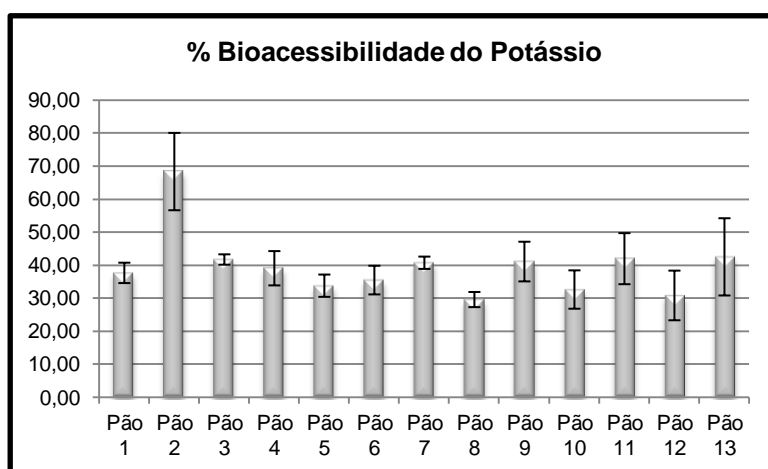


Figura 3.15: Percentagem de bioacessibilidade do potássio nos 13 pães em análise. As barras de erro representam o desvio padrão.

4. Conclusão

Com a realização deste trabalho foi possível verificar que, dos quatro elementos em análise, nomeadamente o zinco, cálcio, magnésio e potássio a bioacessibilidade do cálcio foi a mais afetada pela presença dos aditivos e a do potássio a menos afetada. O ácido ascórbico isoladamente exerceu um efeito positivo sobre a bioacessibilidade do zinco e não afetou de forma significativa a bioacessibilidade do magnésio e do potássio. Já o E472e foi o aditivo que afetou de forma mais negativa a biodisponibilidade do zinco, possivelmente devido ao aumento do teor em cálcio que resulta da utilização deste aditivo. O E471, o E472e e a lecitina diminuíram a bioacessibilidade do magnésio. Em relação ao cálcio, todos os aditivos afetaram a sua solubilização. Contudo, o ácido ascórbico foi o que menos afetou a percentagem de bioacessibilidade do cálcio e o efeito mais acentuados resultou do uso de todos os aditivos de forma conjugada, apresentando o cálcio nestes pães uma diminuição de cerca de 98% da percentagem de bioacessibilidade em relação ao pão sem aditivos. O efeito que os vários aditivos exerceram sobre a solubilização dos elementos em análise pode resultar destes interferirem diretamente com os minerais, por exemplo por alteração do estado de oxidação ou por formação de complexos, ou de interferirem com outros constituintes do pão, resultado desta interação uma menor solubilização destes elementos.

Contudo, é importante salientar, que os resultados obtidos têm de ser encarados como resultados preliminares requerendo um estudo mais detalhado que lhes possa conferir mais consistência. A incerteza associada aos resultados resultou da pior concordância entre replicados, que se verificou na quantificação dos minerais solubilizados durante as digestões *in vitro*, resultando em desvios padrão relativamente elevados. Este facto pode, pelo menos em parte, ter resultado do nível de metais existente nos brancos. A variação entre replicados foi menos notória no caso do magnésio, possivelmente por ser o caso em que se verificou uma maior distância entre o nível de metais no branco e nas amostras.

A interferência do branco pode ainda ter condicionado os resultados de duas outras formas diferentes. Assim, por um lado o cálculo dos minerais bioacessíveis foi feito subtraindo o valor dos minerais presentes na fração solúvel do branco, partindo do pressuposto que a distribuição dos minerais entre o pellet e o sobrenadante do branco não é afetada pela presença das amostras, premissa que não conseguimos comprovar. Por outro lado, existência de metais no branco pode ter afetado a solubilização dos metais dos pães, originando percentagens de bioacessibilidade inferiores às que se obteriam na sua ausência. Contudo, esta presença de minerais veiculados pela bÍlis também ocorre na situação real. Esta interferência pode ter sido especialmente importante no caso do zinco, uma vez que se conhece a que a solubilização deste metal é afetada pela presença do cálcio, facto que foi igualmente observado no presente estudo. Apesar de poder ter afetado os valores absolutos das percentagens de bioacessibilidade, esta interferência não deve ter afetado os seus valores relativos, uma vez

que a interferência do branco foi constante em todos pães. Contudo, no caso do cálcio e do magnésio é pouco provável que as percentagens de bioacessibilidade tenham sido influenciadas pelos metais provenientes do branco, uma vez que se obtiveram percentagens de cerca de 100%.

Uma maneira de reduzir as condicionantes do presente trabalho seria a substituição da bílis bovina desidratada, uma vez que esta deve ter constituído a principal fonte de minerais no branco, por uma solução de sais biliares purificados, nomeadamente o desoxicolato e o colato de sódio. Seria igualmente interessante aprofundar mais este estudo introduzindo os modelos celulares para estudo da absorção aliando os estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade.

Este estudo, apesar de todas as limitações já referidas, aponta no sentido dos aditivos de panificação poderem condicionar a bioacessibilidade dos minerais. Este resultado é particularmente importante no contexto dos estudos de biofortificação de farinhas, podendo afetar de forma significativa o benefício resultante dessa biofortificação.

5. Bibliografia

- Akhter, S., Saeed, A., Irfan, M., Malik, K. A., 2012. *In vitro* dephytinization and bioavailability of essential minerals in several wheat varieties. *Journal of Cereal Science* 56, 741-746 .
- Allen, L., Benoist B., Dary, O., Hurrell, R., (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients. World Health Organization; Food and Agricultural Organization of the United Nations. WHO Library, 1-376.
- Almeida, M.D.V. & Afonso, C.I.P.N., (1997). *Princípios básicos de alimentação e nutrição*. Universidade Aberta, Lisboa, Portugal.
- Amarakoon, D., Thavarajah, D., McPhee, K., Thavarajah, P., 2012. Iron-, zinc-, and magnesium-rich field peas (*Pisum sativum* L.) with naturally low phytic acid: A potential food-based solution to global micronutrient malnutrition. *Journal of Food Composition and Analysis* 27, 8–13.
- Ammerman, C. B., Baker, D. H., Lewis, A. J., 1995. *Bioavailability of Nutrients for Animals – Amino Acids, Minerals, and Vitamins*. Academic Press, California, USA.
- AOAC (1990) *Official Methods of Analysis*. Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs. Volume I, 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, EUA.
- Bass, J. K., Chan, G. M., 2006. Calcium nutrition and metabolism during infancy. *Nutrition* 22, 1057–1066.
- Basu, T. K., Donaldson, D., 2003. Intestinal absorption in health and disease: micronutrients. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17 (6), 957–979.
- Behall, K. M., Howe, J. C., Anderson, R. A., 2002. Apparent Mineral Retention Is Similar in Control and Hyperinsulinemic Men after Consumption of High Amylose Cornstarch. *Journal of Nutrition* 132, 1886–1891.
- Belitz, H.-D., Grosh, W., Schieberle, P., 2009. *Food Chemistry*. Springer, 4th revised and extended Edition, Berlin, Germany.
- Belz, M. C. E., Ryan, L. A. M., K. Arendt, E. K., 2012. The Impact of Salt Reduction in Bread: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52, 514–524.
- Benito, P., Miller, D., 1998. Iron Absorption and Bioavailability: An Updated Review. *Nutrition Research* 18 (3), 581-603.
- Bosscher, D., Caillie-Bertrand, M. V., Deelstra, H., 2001. Effect of Thickening Agents, Based on Soluble Dietary Fiber, on the Availability of Calcium, Iron, and Zinc From Infant Formulas. *Nutrition* 17, 614–618.
- Brandão, S. S., Lira, H. L., 2011. *Tecnologia de panificação e confeitaria*. e-tec Brasil Escola Técnica Aberta do Brasil; UFRPE/CODAI.
- Braschi, A., Gill, L., Naismith, D. J., 2009. Partial substitution of sodium with potassium in white bread: feasibility and bioavailability. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60(6), 507-521.
- Brigide, P., Ataíde, T. R., Baptista, A. S., Abdalla, A. L., Canniatti-Brazaca, S. G., Silva, T. S., Castilho, L. A., Peçanha, M. R. S. R., Sant'Ana, A. E. G., 2011. Biodisponibilidade do ferro: marcação radioisotópica. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.* 36, n. 3, 93-107.

Brites, C. M., Trigo, M. J., Carrapiço, B., Alviña, M., Bessa, R. J., 2011. Maize and resistant starch enriched breads reduce postprandial glycemic responses in rats. *Nutrition Research* 31, 302–308.

Bueschelberger, H.-G., 2004. Lecithins. In: Whitehurst R. J.; *Emulsifiers in Food Technology*; Blackwell Publishing Ltd., 1-39.

Canella-Rawls, S. C., 2003. *Pão arte e ciência*. Editora Senac São Paulo, 97.

Cauvain, S. P., Young, L. S., 2006. *Baked Products: Science, Technology and Practice*. Blackwell Publishing, UK.

Clemens, S., 2014. Zn and Fe biofortification: The right chemical environment for human Bioavailability. *Plant Science* 225, 52–57.

Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., Tang, M. C., 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids* 23, 1527-1534.

Coudray, C., Levrat-Verny, M. A., Tressol, J. C., Feillet-Coudray, C., Horcajada-Molteni, N. M., Demigné, C., Rayssiguier, Y., Rémésy, C., 2001. Mineral supplementation of white wheat flour is necessary to maintain adequate mineral status and bone characteristics in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 15, 131-137.

Coulter, T. P., 2002. *Food: The Chemistry of Its Components*. Fourth Edition. The Royal Society of Chemistry, Reino Unido, 43.

Cozzolino, S. M. F., 1997. Biodisponibilidade de minerais. *R. Nutr. Campinas* 10(2), 87-98.

Cruz, J. B. F., Soares, H. F., 2011. Uma revisão sobre o zinco. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde* 15 (1), 207-222.

Cubadda, F., Aureli, F., Raggi, A., Carcea, M., 2009. Effect of milling, pasta making and cooking on minerals in durum wheat. *Journal of Cereal Science* 49, 92–97.

Decreto-Lei n.º 121/98 do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas que transpõe para o ordenamento jurídico interno as Directivas n.os 95/2/CE e 96/85/CE, ambas do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Fevereiro de 1995 e de 19 de Dezembro de 1996, que estabelecem as condições a que deve obedecer a utilização dos aditivos alimentares, com excepção dos corantes e dos edulcorantes. *Diário da República* 106/98 SÉRIE I-A de 1998-05-08.

Delgado-Andrade, C., Seiquer I., Navarro, M. P., 2008. Maillard reaction products consumption: Magnesium bioavailability and bone mineralization in rats. *Food Chemistry* 107, 631–639.

Dewettinck, K., Van Bockstaele, F., Kühne, B., Van de Walle, D., Courtens, T.M., Gellynck, X., 2008. Nutritional value of bread: influence of processing, food interaction and consumer perception. *Journal of Cereal Science* 48, 243–257.

DiMuzio, 2010. *Breadmaking an Artisan's Perspective*. John Wiley & Sons Inc., Estados Unidos da América, 19.

Domínguez-González, R., Romarís-Hortas, V., García-Sartal, C.; Moreda-Piñeiro, A., Barciela-Alonso, M. C., Bermejo-Barrera, P., 2010. Evaluation of an in vitro method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds. *Talanta* 82, 1668–1673.

Eklund-Jonsson, C., Sandberg, A. S., Alminger, M. L., 2006. Reduction of phytate content while preserving minerals during whole grain cereal temper fermentation. *Journal of Cereal Science* 44, 154–160.

Etcheverry, P., Grusak, M. A., Fleige, L. E., 2012. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in physiology* 3, Article 317.

Fairweather-Tait, S. J., 1995. Iron-zinc and calcium-Fe interactions in relation to Zn and Fe absorption. Symposium on 'Micronutrient interactions', *Proceedings of the Nutrition Society* 54, 465-473.

Fan, M-S., Zhao, F-J., Fairweather-Tait, S. J., Poulton, P. R., Dunham, S. J., McGrath, S. T., 2008. Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22, 315-324.

FAO (2001) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation Bangkok, Thailand.

Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 475(1-2), 89-111.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Pérez-Gálvez, A., 2009. *In vitro* bioaccessibility assessment as prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research* 29, 751-760.

Ferrarini, S. F., 2007. Desenvolvimento de metodologia alternativa para a determinação de elementos em nível de traços em amostras de carvão pela técnica de ICP-OES. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química; Porto Alegre.

Frontela, C., Ros, G., Martínez, C., 2011. Phytic acid content and "in vitro" iron, calcium and zinc bioavailability in bakery products: The effect of processing. *Journal of Cereal Science* 54, 173-179.

Bouhallab, S., Bouglé, D., 2003. Caséinophosphopeptides et biodisponibilité minérale. In: Gaucheron, F., Minéraux et produits laitiers. Editeur Lavoisier, 764-780.

Gaupp, R., Adams, W., 2004. Di-acetyltartaric esters of monoglycerides (DATEM) and associated emulsifiers in bread making. In: Whitehurst R. J., *Emulsifiers in Food Technology*. Blackwell Publishing Ltd., 86-108.

Gellynck, X., Kühne, B., Bockstaele, F. V., Van de Walle, D., Dewettinck, K., 2009. Consumer perception of bread quality. *Appetite* 53, 16-23.

Germani, R., Ascheri, J. L. R., Silva, F. T., Torrezan, R., Silva, K. L., Netto, A. G., Nutti, M. R., 2001. Manual de Fortificação de Farinha de Trigo com Ferro. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Embrapa, Rio de Janeiro.

Germano, R. M. A., Canniatti-Brazaca, S. G., 2002. Importância do ferro em nutrição humana. *Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição* 24, 85-104.

Giannou, V., Kessoglou, V., Tzia, C., 2003. Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. *Trends in Food Science & Technology* 14, 99-108.

Gibson, R. S., Perlas, L., Hotz, C., 2006. Improving the bioavailability of nutrients in plant foods at the household level. *Proceedings of the Nutrition Society* 65, 160-168.

Gomes da Costa, H. R. V., 2011. Análise de produtos de nutrição infantil por fluorescência de rx. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Universidade de Aveiro, Portugal.

Gómez, A., Ferrero, C., Calvelo, A., Añón, M. C., Puppo, M. C., 2011. Effect of mixing time on structural and rheological properties of wheat flour dough for breadmaking. *International Journal of Food Properties* 14, 583–598.

Grases, F., Simonet, B. M., Prieto, R. M., March, J. G., 2001. Dietary phytate and mineral bioavailability. *Journal Trace Elements in Medicine and Biology* 15, 221-228.

Grüdtner, V. S., Weingrill, P., Luiz Fernandes, A. L., 1997. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. *Rev. Bras. Reumatol* 37 (3), 143-151.

Guerreiro, L., 2006. Dossiê Técnico – Panificação. REDETEC – Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro.

Hambidge, M., 2000. Human Zinc Deficiency. *J. Nutr.* 130, 1344—1349.

Hidalgo, A., Andrea Brandolini, A., 2011. Heat damage of water biscuits from einkorn, durum and bread wheat flours. *Food Chemistry* 128, 471–478.

Holst, B., Williamson, G., 2008. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 73–82.

House, W. A., 1999. Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. *Field Crops Research* 60, 115-141.

Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J., 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry* 125, 1–12.

INSA, 2003. Determinação de minerais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivo acoplado. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Departamento de Alimentação e Nutrição, Lisboa, Portugal.

Intawongse, M., Dean, J. R., 2006. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *Trends in Analytical Chemistry* 25 (9), 876-886.

Isserliyska, D., Karadjov, G., Angelov, A., 2001. Mineral composition of Bulgarian wheat bread. *Eur. Food Res. Technol.* 213, 244–245.

Johnson, Q., Mannar, V., Ranum, P., 2004. Fortification Handbook – Vitamin and mineral fortification of wheat flour and maize meal. The Micronutrient Initiative, Editors Annie Wesley, Peter Ranum.

Karadzov, G., Iserliyska, D., 2003. Sensory quality of minerally fortified bread. *Eur. Food. Res. Technol.* 216, 274–276.

Khouzam, R. B., Pohl, P., Lobinski, R., 2011. Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables. *Talanta* 86, 425-428.

Kira, C. S., 2002. Estudo da composição mineral e dos elementos traço essenciais em amostras de leite e produtos lácteos por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido e análise por ativação com neutrons. Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações; São Paulo.

Kohlmeier, M., 2003. Nutrient Metabolism. Academic Press, USA.

Ktenioudaki, A., Alvarez-Jubete, L., Gallagher, E., 2013. A review of the process-induced changes in the phytochemical content of cereal grains: The breadmaking process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2012.667848.

Larsen T. & Sandstrom B., 1992. Effect of Calcium, Copper, and Zinc Levels in a Rapeseed Meal Diet on Mineral and Trace Element Utilization in the Rat. *Biological Trace Element Research* 35, 167-184.

Leal, A. S.; Gonçalves, C. G., Vieira, I. F. R., Cunha, M. R. R., Gomes, T. C. B., Marques, F. R., 2010. Evaluation of mineral concentration and anti-nutritional factors phytate and oxalate in Multimix from the Metropolitan Region of the City of Belo Horizonte/MG. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian* 35 (2), 39-52.

Lei N.º 75/2009. 2009. Estabelece normas com vista à redução do teor de sal no pão bem como informação na rotulagem de alimentos embalados destinados ao consumo humano. *Diário da República* N.º155, 1ª Série, 12 de Agosto de 2009, 5225.

Leyn, I. D., (2006) Functional Additives. In Hui YU Ed. *Bakery Products: Science and Technology*. Blackwell Publishing, Estados Unidos da América, 233 -242.

Liang, J., Han, B.-Z., Nout, M. J. R., Hamer, R. J., 2008. Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and in vitro soluble zinc in brown rice. *Food Chemistry* 110, 821–828.

Lidon F., Silvestre M. M., 2008. *Conservação de Alimentos Principios e Metodologias*. Escolar Editora.

Lobo, A. S., Tramonte, V. L. C., 2004. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. *Rev. Nutr.* 17(1), 107-113.

Lopes, A. S., Ormenese, R. C. S. C., Montenegro, F. M., Ferreira Júnior, P. G., 2007. Influência do uso simultâneo de ácido ascórbico e azodicarbonamida na qualidade do pão francês. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas 27(2), 307-312.

Martinbianco, F., 2011. Desenvolvimento da tecnologia para a produção de pão sourdough: aspectos da produção de inóculo e qualidade sensorial de pães. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Porto Alegre, Brasil.

Martins, I. (Compilador), 2007. *Tabela da Composição de Alimentos/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge*. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Lisboa, 76-77.

Martos, F. C., 2004. Biodisponibilidad mineral de menús escolares. Tesis Doctoral, Dpto. De Bromatología y Tecnología de Alimentos, Universidad de Córdoba.

Miller, D. D., 2008. Componentes Minoritários dos Alimentos – Minerais. In: Damodaran, S., Parkin, K., Fennema, O. R., *Química de Alimentos de Fennema*. Artmed Editora, Porto Alegre, Brasil, 209-444.

Miranda, M. Z., 2006. Trigo: germinação e posterior extrusão para obtenção de farinha integral extrusada de trigo germinado. Embrapa, Documentos online 74.

Mondal, A., Datta, A. K., 2008. Bread baking – A review. *Journal of Food Engineering* 86, 465–474.

Navarro, P., Aspe, T., Seiquer, I., 2000. Zinc Transport in Caco-2 Cells and Zinc Balance in Rats: Influence of the Heat Treatment of a Casein-Glucose-Fructose Mixture. *J. Agric. Food Chem* 48, 3589-3596.

Oury, F.-X., Leenhardt, F., Rémésy, C., Chanliaud, E., B. Duperrier, B., Balfourier, F., Charmet G., 2006. Genetic variability and stability of grain magnesium, zinc and iron concentrations in bread wheat. *European Journal Agronomy* 25, 177–185.

Pereira, G. A. P., Genaro, P. S., Pinheiro, M. M., Szejnfeld, V. L., Martini, L. A., 2009. Cálcio dietético – estratégias para otimizar o consumo. *Rev Bras Reumatol* 49(2), 164-80.

Pérès, J.-M., Bureau, F., Neuville, D., Arhan, P., Bouglé, D., 2001. Inhibition of zinc absorption by iron depends on their ratio. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 15, 237-241.

Piekarski, F. V. B. W., 2009. Folha de abóbora: Caracterização físico-química, mineral e efeito da adição na reologia da massa e na qualidade sensorial de pães contendo fibra alimentar. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Curitiba.

Plácido, A., Kupers, R., Paíga, P., Magalhães, J., Nouws, H. P. A., Delerue-Matos, C., Oliveira, M.B.P.P., 2012. Salt content in bread and dough from northern Portugal: Method development and comparison. *Journal of Food Composition and Analysis* 27, 14–20.

Pomeranz, Y., 1992. *Functional Properties of Food Components*. Second Edition, California.

Portaria n.º 72/2008. 2008. A presente portaria define as normas técnicas, as características e as condições a observar na produção, valorização e comercialização do sal alimentar na forma tal qual. *Diário da República*, N.º 16, 1.ª série, 23 de Janeiro de 2008, 689.

Portaria nº 254/2003. 2003. Relativa à fixação das normas técnicas relativas à definição, caracterização, composição, acondicionamento, rotulagem, métodos de análise, tolerâncias analíticas e comercialização das farinhas destinadas à panificação e a outros fins e das sêmolos destinadas ao fabrico de massas alimentícias e a usos culinários. *Diário da República*, N.º 66, I Série-B, 19 de Março de 2003, 1861.

Pyler, E. J., Gorton, L. A., 2008. *Baking Science & Technology*. Vol. I: Fundamentals & Ingredients, United States of America, 391.

Regulamento (UE) N.º 1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011. que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 295/1 - L 295/177.

Ronayne, P., Brites, C., Ferrero, C., Arocha, M., Leon, A. E., 2009. Efecto de los tratamientos tecnológicos sobre la calidad nutricional y saludable de panes y productos de panadería. In: Mariane Lutz, Alberto Edel León Editores. *Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación.*, Chile, 120-146.

Roncero-Ramos, I., Delgado-Andrade, C., Morales, F. J., Navarro, M. P., 2013. Influence of Maillard products from bread crust on magnesium bioavailability in rats. *J. Sci. Food. Agric.* 93, 2002–2007.

Rosini, F., Matos, W. O., Santos, M. C., Nóbrega, J. A., 2006. Resolução Conama nº375 e técnicas espectroanalíticas meios adequados aos fins? *Revista Analytica* 22, 74-85.

Sandstrom B., 1995. Considerations in Estimates of Requirements and Critical Intake of Zinc, Adaption, Availability and Interactions. *Analyst* 120, 913-915.

Sandstrom B., 2001. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *British Journal of Nutrition* 85, Suppl. 2, 181-185.

Santos, H. B., Madruga, M. S., Bion, F. M., Antunes, N. L. M., Mendes, K., Àguida, R., 2004. Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais numa dieta enriquecida com multimistura. *Ciênc.Tecnol.Aliment.* 24 (4), 613-618.

Scheuer, P. M., Francisco, A., Miranda, M. Z., Limberger, V. M., 2011. Review Trigo: características e utilização na panificação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 13(2), 211-222.

Schumann, K., Elsenhans, B., 2002. The impact of food contaminants on the bioavailability of trace metals. *Jornal of Trace Elements in Medicine and Biology* 16, 139-144.

Shenkin, A., 1997. Micronutrients and Outcome. *Nutrition* 13(9), 825-828.

Shewry, P. R., 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany* 60(6), 1537–1553.

Silva, M. R., Silva, M. A. A. P., 1999. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. *Rev. Nutr. Campinas* 12(1), 5-19.

Soares, R., Escaleira, V., Monteiro, M. I. C., Pontes, F. V. M., Santelli, R. E., Bernardi, A. C. C., 2010. Uso de ICP OES e titrimetria para a determinação de cálcio, magnésio e alumínio em amostras de solos. *R. Bras. Ci. Solo* 34, 1553-1559.

Sousa, L. M. C., 2012. Incorporação e otimização de aditivos alimentares e auxiliares tecnológicos em produtos de panificação. Relatório de estágio apresentado à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar.

Stampfli, L., Nerden, B., 1995. Emulsifiers in bread making. *Food Chemistry* 52, 353-360.

Tokalioglu, S., Clough, R., Foulkes, M., Worsfold, P., 2014. Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. *Food Chemistry* 150, 321–327.

Van Campen, D. R., Glahn, R. P., 1999. Micronutrient bioavailability techniques: Accuracy, problems and limitations. *Field Crops Research* 60, 93-113.

Van Dyck, K., Tas, S., Robberecht, H., Deelstra, H., 1996. The influence of different food components on the in vitro availability of iron, zinc and calcium from a composed meal. *International Journal of Food Science and Nutrition* 47, 499-506.

Vandecasteele, C., Block, C.B., 1993. *Modern Methods for Trace Element Determination*, John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido.

Velu, G., *et al.*, Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat, *Journal of Cereal Science* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2013.09.001>.

Williams, T., Pullen, G., 2007. Functional Ingredients. In: Cauvain, S. P., Young, L. S., *Technology of breadmaking*. Springer, Second Edition, UK, 51-89.

Wolber, F. M., Beck, K. L., Conlon, C. A., Kruger, M. C., 2013. Kiwifruit and Mineral Nutrition. In Mike Boland and Paul J. Moughan, editors: *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol. 68, Burlington: Academic Press, 233-256.

Zhao, F. J., Su, Y. H., S.J. Dunham, S. J., Rakszegi, M., Bedo, Z., McGrath, S. P., Shewry, P. R., 2009. Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. *Journal of Cereal Science* 49, 290–295.

Zhao, F-J., Shewry, P. R., 2011. Recent developments in modifying crops and agronomic practice to improve human health. *Food Policy* 36, 94–101.

Portais de Internet:

<http://www.harinaspolo.com/granotrigo.php>.

<http://www.asae.pt/pagina.aspx?f=3&back=1&id=8112&back=1&chave=aditivos&tema=&avance=%29>. Consultado 14/04/2014.

6. Anexos

Anexo I: Aditivos adicionados aos diferentes pães ensaiados.

| Aditivo(s) | |
|------------|---|
| Pão 1 | - |
| Pão 2 | 25 mg/Kg Ácido Ascórbico |
| Pão 3 | 0,3% E471 |
| Pão 4 | 1% E471 |
| Pão 5 | 0,15% E472e |
| Pão 6 | 0,3% E472e |
| Pão 7 | 0,15% Lecitina |
| Pão 8 | 0,3% Lecitina |
| Pão 9 | 25 mg/Kg Ácido Ascórbico + 0,3% E471 + 0,15% E472e + 0,15% lecitina |
| Pão 10 | 25 mg/Kg Ácido Ascórbico + 1% E471 + 0,3% E472e + 0,3% lecitina |
| Pão 11 | 25 mg/Kg Ácido Ascórbico + 1% E471 |
| Pão 12 | 25 mg/Kg Ácido Ascórbico + 0,3% E472e |
| Pão 13 | 25 mg/Kg Ácido Ascórbico + 0,3% Lecitina |